



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE FARMACIA

**Estudios de cristalización enantioselectiva de *rac*-
Guaifenesina con aditivos quirales**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA**

Presenta:

L. F. Pablo Luis Gutiérrez Vergara

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESUS RIVERA ISLAS

CUERNAVACA, MORELOS

2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UAEM

Facultad
de Farmacia

Conocimiento al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 15 de marzo de 2019
Folio: FF/D/SAc/ CIP /MF/043/2019

L.F. PABLO LUIS GUTIÉRREZ VERGARA
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "**Estudios de cristalización enantioselectiva de rac-Guaifenesina con aditivos quirales**"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

SECRETARIO: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

V.1. Dr. Thomas Buhse Michelsen

V.2. Dr. Herbert Höpfl Bachner

V.3. Dr. Julio César Rivera Leyva

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.

Jefatura de Posgrado



ccp: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Sergio Alcalá Alcalá, Dr. Thomas Buhse Michelsen, Dr. Herbert Höpfl Bachner, Dr. Julio César Rivera Leyva

mitv

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Este proyecto de tesis se desarrolló en el laboratorio 4 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de tesis del Dr. Jesús Rivera Islas.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Jesús, por brindarme la oportunidad y confianza de realizar uno de sus proyectos. Sinceramente mi respeto y admiración para usted.

Al comité revisor de tesis: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Sergio Alcalá Alcalá, Dr. Thomas Buhse Michelsen, Dr. Herbert Höpfl Bachner y al Dr. Julio César Rivera Leyva, muchas gracias por todas sus observaciones, aportaciones disposición y tiempo para la culminación de este trabajo.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y a la Facultad de Farmacia, por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Se agradece al CONACyT por la asignación de beca para estudios de posgrado con número de registro 825138, los apoyos a través de INF-2015-251898 e INFR-2014-01-226114 y al PRODEP a través del proyecto 103.5/14/10994.

Dedicatorias

A nadie! Yo loNa a todos!!!

Índice general

Índice general	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas.....	vi
Anexos	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstrac	x
1 Introducción	1
2 Antecedentes.....	2
2.1 Quiralidad	2
2.1.1 Quiralidad molecular.....	3
2.1.2 Estereoisómeros y descriptores quirales	3
2.1.3 Enantiómeros	5
2.1.4 Diastereómeros	5
2.1.5 Mezcla Racémica: racemato y conglomerado.....	6
2.1.6 Homoquiralidad en sistemas biológicos	7
2.2 Fármacos quirales	8
2.3 Técnicas de obtención de moléculas enantiopuras.....	10
2.3.1 Síntesis asimétrica.....	10
2.3.2 Resolución enzimática.....	11
2.3.3 Cristalización tradicional	12
2.4 Técnicas de elucidación/detección de moléculas quirales	15
2.4.1 Difracción de rayos X de polvos.....	15
2.4.2 Polarimetría	17
2.5 Guaifenesina	19
2.5.1 Estructura cristalográfica de Guaifenesina.....	20
2.5.2 Otros usos de Guaifenesina	21
3 Justificación	22
4 Hipótesis.....	22
5 Objetivos.....	23
5.1 Objetivo general	23

5.2	Objetivos específicos.....	23
6	Procedimientos.....	24
6.1	Diagrama general de trabajo.....	24
6.2	Materiales y Equipos.....	25
6.3	Métodos de preparación de nuevas fases sólidas.....	26
6.3.1	Reacción de Molienda (RxM).....	26
6.3.2	Reacción slurry (RxS).....	26
6.3.3	Cristalización tradicional.....	27
6.3.4	Variantes de cristalización.....	27
6.4	Caracterización de sólidos.....	29
6.4.1	Difracción de rayos X de polvos (DRXP).....	29
6.4.2	Polarimetría.....	29
7	Resultados y discusión.....	31
7.1	Criterios de selección de aditivos quirales y disolventes orgánicos.....	31
7.2	Caracterización por Difracción de Rayos X de Polvos de <i>rac</i> -Guaifenesina y aditivos quirales.....	33
7.3	Estudios experimentales de reacción por slurry.....	35
7.4	Estudios experimentales de reacción por molienda mecánica.....	40
7.5	Estudios experimentales de cristalización en solución líquida.....	41
7.5.1	Cristalización en solución homogénea sobresaturada.....	41
7.6	Cristalización en solución bifásica.....	43
7.6.1	Cristalización en la interfase con soluciones saturadas y volúmenes iguales	43
7.7	Polarimetría.....	52
7.8	Resonancia magnética nuclear ^1H	54
8	Conclusiones.....	61
9	Perspectivas.....	62
10	Anexos.....	63
11	Bibliografía.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Las manos como objetos quirales.	2
Figura 2. Quiralidad en la naturaleza. Imágenes tomadas de la referencia 3.	2
Figura 3. Representación de un compuesto con un centro quiral y su imagen especular. (modificado de la referencia 5).....	3
Figura 4. Orden de prioridad de acuerdo con el sistema CIP en un carbono quiral.	4
Figura 5. Relación de pares enantioméricos.	5
Figura 6. Diastereómeros con asignación CIP (modificado de la referencia ¹³).	6
Figura 7. Representación esquemática de: A) racemato y b) conglomerado (tomado y modificado de la referencia 11).....	6
Figura 8. a) Racemato de ácido D-(2S,3S)- y L-(2R,3R)-tartárico y b) conglomerado de L y D tartrato de amonio sódico. Tomado de CCDC (Deposition Number: 1475949) y analizado en mercury®.	7
Figura 9. Representación esquemática de una síntesis asimétrica.	11
Figura 10. Sintones supramoleculares empleados en la formación de co-cristales. Se conoce como homosintón cuando se produce la interacción de grupos funcionales similares en las moléculas complementarias y heterosintón cuando la interacción está formada por grupos funcionales diferentes. ³⁹	13
Figura 11. a) Representación esquemática de la obtención de diastereoisómeros a partir de una mezcla racémica y un co-formador enantiopuro. b) co-cristal de R-PZQ:L-Mal obtenido a través de la metodología similar al inciso a (tomado y modificado de la referencia 52).....	15
Figura 12. Relación de cristalización de enantiómeros. Recuadros azules: pares de enantiómeros, recuadros rojos: pares de polimorfos y flechas verdes: enantiómeros con distinto arreglo cristalino.	16
Figura 13. Difractogramas de: a) DLTar, b) LTar y c) DTar. Datos tomados de CCDC (códigos ZZZDui02, TARTAL04 y TARTAC), extraídos con Mercury® 3.8 y esquematizados con Origin® 9.	17
Figura 14. Representación esquemática de un polarímetro. Líneas sólidas: antes de la rotación, líneas punteadas: después de la rotación, α es el ángulo de rotación (Adecuado de la referencia 6).	18
Figura 15. Estructuras moleculares y cristalográficas de: a) guaifenesina, b) cadena unidireccional de guaifenesina c) sintón de guaifenesina y d) estructura tubular de	

guaifenesina. Tomado de CCDC (Deposition Number 693625) y analizado en mercury®.	20
Figura 16. Guaifenesina como precursor de otros IFA's. ⁹²	21
Figura 17. Representacion esquematica de la variante 1.....	28
Figura 18. Representacion esquematica de la variante 2.....	28
Figura 19. Artefacto utilizado para realizar el análisis a través de placas polarizadas.	30
Figura 20. Estructuras químicas de los aditivos quirales seleccionados.....	31
Figura 21. Posibles sintones entre <i>rac</i> -guaifenesina y los aditivos quirales seleccionados.	32
Figura 22. Patrones de difracción de las materias prima en los disolventes seleccionados bajo condiciones de slurry: a) <i>rac</i> -Guai, b) ácido D-málico (DMal), c) ácido L-málico (LMal), d) ácido DL-málico (DLMal), e) ácido D-tartárico (DTar), f) ácido L-tartárico (LTar), g) ácido D-aspártico (DAsp) y h) ácido L-aspártico (LAsp) contra el sólido directo del envase (Env).	34
Figura 23. Puentes de hidrógeno intramoleculares del ácido aspártico. Tomado de CCDC (Deposition Number 103651) y analizado en mercury®.	36
Figura 24. Patrones de DRXP de la RxS de <i>rac</i> -Guai con los ácidos a) DTar y b) Ltar con estequiometrías 1:1, 1:2 y 1:3 (IFA:AQ) y c) DLTar en estequiometría 1:3 (IFA:AQ) en acetona. Las líneas punteadas son una guía visual para las señales que se modifican... 37	37
Figura 25. Patrones de difracción de a) <i>rac</i> -Guai:DTar y b) <i>rac</i> -Guai:LTar en estequiometrías 1:3 y 1:4 (IFA:AQ) comparado con las materias prima.....	38
Figura 26. Patrones de difracción de a) <i>rac</i> -Guai:DTar y b) <i>rac</i> -Guai:LTar en estequiometrías 1:3 (IFA:AQ) con diferentes tiempos de reacción 5, 15 y 20 horas usando acetona como medio de reacción. Las líneas punteadas son una guía visual para las señales que se modifican.	39
Figura 27. Difractogramas de RxM NG de a) <i>rac</i> -Guai:DTar (1:3), b) <i>rac</i> -Guai:LTar (1:3) y RxM SD utilizando acetato de etilo c) <i>rac</i> -Guai:DTar (1:3) y d) <i>rac</i> -Guai:LTar (1:3)	40
Figura 28. Cristalización en la interfase con volúmenes iguales. Se comparan comp 1 y comp 2 contra las materias primas.	44
Figura 29. Sólido recuperado de la cristalización en la interfase Var 1 de <i>rac</i> -Guai con LTar, donde: I) fracción del cristal A opaca a 45°, II) fracción del cristal B opaca a 135° y III) PDRX de las materias prima comparado con las fracciones que presentaron interacción con la luz polarizada.	47

Figura 30. Sólido recuperado de la cristalización en la interfase (Var 2) de <i>rac</i> -Guai con DTar, donde: I) fracción del cristal Izq clara a 45°, II) fracción del cristal Der clara a 135° y III) PDRX de las materias prima comparado con las fracciones que presentaron interacción con la luz polarizada.	49
Figura 31. Espectros de RMN- ¹ H de las materias primas.....	55
Figura 32. Espectros de RMN- ¹ H de la variante 1 entre: <i>rac</i> -Guai:DTar con estequiometría 1:3	56
Figura 33. Espectros de RMN- ¹ H de la variante 2 entre: <i>rac</i> -Guai:DTar con estequiometría 1:3	57
Figura 34. Espectros de RMN- ¹ H de la variante 3 entre: <i>rac</i> -Guai:DTar y <i>rac</i> -Guai:LTar con estequiometría 1:3	58
Figura 35. Espectros de RMN- ¹ H de la variante 4 entre: <i>rac</i> -Guai:LTar con estequiometría 1:3.....	59

Índice de imágenes

Imagen 1. Cristalización del Clorato de sodio, forma Izquierda: L-NaClO ₃ y forma Derecha D-NaCl ₃	19
Imagen 2. Formas de cristalización de Guaifenesina racémica.	41
Imagen 3. Observaciones de la cristalización de Guaifenesina racémica en diferentes disolventes orgánicos.	42
Imagen 4. Cristalización en la interfase con volúmenes equivalentes	43
Imagen 5. Película obtenida del experimento de cristalización en la interfase de <i>rac</i> -Guai:DTar 1:3	45
Imagen 6. Cristalización en la interfase con volumen compensado (Var 1) de <i>rac</i> -Guai en agua y DTar en acetato de etilo.	46
Imagen 7. Fotografía del cristal obtenido del experimento de cristalización por sembrado en liquido (Var 2) de <i>rac</i> -Guai:DTar 1:3	48
Imagen 8. Sembrado en líquido (Var 2) de <i>rac</i> -Guai en agua y DTar en acetato de etilo en saturación.	48
Imagen 9. Observaciones de los cristales obtenidos sin filtro y a través de placas polarizadas a 45° y 135°	51

Imagen 10. Observaciones de los cristales obtenidos sin filtro y a través de placas polarizadas a 45° y 135° 52

Índice de tablas

Tabla 1. Diferencias farmacológicas entre fármacos quirales. 9

Tabla 2. Disolventes seleccionados por su capacidad de formar puentes de hidrógeno e hidrofobicidad. 32

Tabla 3. Resultados del screening por reacción de slurry..... 35

Tabla 4. Composición de las mezclas para Var 3 y 4. 50

Tabla 5. Rotación óptica de los cristales recuperados a partir de las placas polarizadas colocadas en ángulo de 45°de las Var 3 y 4 de *rac-Guai:DTar* y *rac-Guai:LTar* con estequiometría 1:3 (IFA:AQ). 53

Tabla 6. Predicción de la estequiometría en los productos recuperados en las variantes de cristalización. 60

Anexos

- Anexo 1.** Difractograma representativo del comportamiento de *rac*-Guaifenesina con los ácidos málicos (D, L y DL) con estequiometría 1:3 comparados con las materias prima en la reacción de slurry utilizando acetato de etilo como medio de reacción..... 63
- Anexo 2.** Difractograma representativo del comportamiento de *rac*-Guaifenesina con los ácidos aspárticos (D y L) con estequiometría 1:3 comparados con las materias prima en la reacción de slurry utilizando acetato de etilo como medio de reacción. 63
- Anexo 3.** Difractograma representativo de la reacción de slurry de *rac*-Guaifenesina con los ácidos D y L Tartáricos con estequiometría 2:1 comparados con las materias prima utilizando acetona como medio de reacción. 64
- Anexo 4.** Difractogramas de RxM SD de a) *rac*-Guai:DTar 1:3 en Acetona. b) *rac*-Guai:LTar (1:3) y RxM SD utilizando acetato de etilo c) *rac*-Guai:DTar (1:3) y d) *rac*-Guai:LTar (1:3). 65
- Anexo 5.** Fotografías de la reproducción de la variante de cristalización Var 3. 66

Abreviaturas

Acet

Acetona

A. de etilo

Acetato de etilo

AQ

Aditivo quirál

ca

Cantidad aproximada

DAsp

Ácido D-Aspártico

DMal

Ácido D-Málico

DMSO

Dimetil sulfóxido

DLMal

Ácido DL-Málico

DTar

Ácido D-Tartárico

DLTar

Ácido DL-Tartárico

DRXP

Difracción de rayos X de polvos

D₂O

Agua deuterada

ee

Exceso enantiomérico

e. g.

Por ejemplo

EtOH

Etanol

g

gramo

Guai

Guaifenesina

H

Hidrógeno

HPLC

Cromatografía líquida de alta resolución

IFA

Ingrediente farmacéutico activo

LAsp

Ácido L-Aspártico

LMal

Ácido L-Málico

LTar

Ácido L-Tartárico

mg

Miligramo

ml

Mililitro

mol

Moles

mmol

Milimoles

MP

Materia prima

NFS

Nueva fase sólida

PDRX

Patrón de difracción de rayos X de polvos

rac-

Mezcla racémica

RxM NG

Reacción por molienda en seco

RxM SD

Reacción por molienda asistida por disolvente

RxS

Reacción por slurry

RO

Rotación óptica

TA

Temperatura ambiente

TAR

Ácido tartárico

Var 1

Variante 1

Var 2

Variante 2

Var 3

Variante 3

Var 4

Variante 4

µm

Microgramos

Resumen

Los sistemas biológicos son enantioselectivos, capaces de diferenciar propiedades farmacológicas y toxicológicas de cada configuración quiral de un compuesto químico. Por tanto, es importante promover la separación quiral de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA's) administrados como mezcla racémica en el uso clínico. Una de las técnicas de resolución quiral es la cristalización preferencial enantioselectiva, esta permite la obtención de diastereoisómeros mediante técnicas convencionales usando aditivos quirales (AQ). Este proyecto busca separar los enantiómeros de la mezcla racémica de Guaifenesina (*rac*-Guai) a través del desarrollo de un método de cristalización preferencial quiral.

Se realizó un screening entre las técnicas de cristalización: molienda (RxM), slurry (RxS) y cristalización en solución, aplicando diferentes estequiometrías IFA:AQ y distintos disolventes orgánicos. Los sólidos resultantes se analizaron por Difracción de Rayos X de Polvos (DRXP), polarimetría (utilizando placas polarizadas y polarímetro) y los que sugirieron indicios de una nueva fase sólida se analizaron por RMN-¹H.

Los experimentos de molienda no dieron resultados positivos, mientras que la cristalización por slurry dio indicios de la posible proporción estequiométrica 1:3 de *rac*-Guai con el ácido D-Tartárico (DTar). Se continuo con experimentos de cristalización en una mezcla bifásica de disolventes. En el disolvente orgánico se disuelve previamente la porción de DTar y en agua *rac*-Guai. Se permite la evaporación hasta observar la presencia de cristales. Se realizaron diferentes variantes a esta técnica tales como el uso en soluciones no saturadas, saturadas y diferencias entre volumen del contenedor.

El análisis microscópico del sólido obtenido de las variantes de cristalización muestra cristales de forma irregular, el análisis mediante las placas polarizadas demostró que los cristales tienen dos contrapartes y cada una es capaz de interaccionar con la luz polarizada. El análisis polarimétrico nos indicó que existe un enriquecimiento enantiomérico hacia uno de los enantiómeros de Guai. El análisis por DRXP demostró que las contrapartes del cristal tienen un patrón de difracción diferente comparado con los materiales de partida. Y el análisis por RMN-¹H de los cristales seleccionados comprueba que Guai y DTar se mantienen estables dentro del cristal pero con diferentes estequiometrías. En conclusión, el enriquecimiento de Guaifenesina con los AQ podría ser (R)-Guai-DTar + (S)-Guai-DTar; sin embargo, no se ha establecido cual es el favorecido.

Abstrac

The biological systems are enantioselective, and capable of differentiating pharmacological and toxicological properties of each chiral configuration. Therefore, it is important to promote the chiral separation of the Active Pharmaceutical Ingredients (IFA's) that are administered as a racemic mixture. Among others, the chiral resolution techniques is the enantioselective preferential crystallization, which allows to obtain diastereomers by conventional techniques using chiral additives (AQ). This project seeks separate the enantiomers of the racemic mixture of Guaifenesin (*rac*-Guai) through the development of a chiral preferential crystallization method.

A screening was performed among the crystallization techniques: grinding, slurry and crystallization in solution, and applying several stoichiometries IFA:AQ and organic solvents. The resulting solids were analyzed by X-ray Powder Diffraction (XRPD), polarimetry (using polarized plates and polarimeter), and those solids suggesting a new solid phase were analyzed by NMR-¹H.

The grinding experiments did not give positive results, whereas the crystallization by slurry led us to the possible 1:3 stoichiometric ratio of *rac*-Guai with D-Tartaric acid (DTar). Crystallization experiments were carried out in a biphasic mixture of solvents. DTar is dissolved in the organic solvent and *rac*-Guai in water. The solvent evaporation is allowed until the presence of crystals is observed. Several variant of crystallization were performed such as considering the use of unsaturated and saturated solutions, and volume differences between containers.

The microscopic analysis of the solid shows irregularly shaped crystals, the analysis using polarized plates showed that the crystals have two counterparts and each one can interact with the polarized light. The polarimetric analysis indicated that there is an enantiomeric enrichment towards one of the enantiomers of Guai. The analysis by XRPD showed that the crystal counterparts have a different diffraction pattern compared to the starting materials. Finally, the NMR-¹H analysis of the selected crystals shows that Guai and DTar remain stable inside the crystal but with different stoichiometries. In conclusion, the enrichment of Guaifenesin with the AQ could be (R)-Guai-DTar + (S)-Guai-DTar, however it has not been established which enantiomer is the preffered one.

1 Introducción

El reconocimiento molecular es específico para todos los procesos bioquímicos en los sistemas biológicos, las enzimas catalizan reacciones biomoleculares por el acoplamiento tridimensional del sustrato. Y todas las estructuras biológicas están constituidas por L-aminoácidos y D-carbohidratos. Por esta razón, los IFA's enantioméricos pueden tener propiedades farmacológicas diferentes y en consecuencia, tienen diferentes efectos en el organismo. Los efectos se ven reflejados en la eficacia de un enantiómero sobre el otro, en el efecto terapéutico que puede ser totalmente diferente entre enantiómeros, o en el peor de los escenarios, que un enantiómero sea terapéutico pero su contraparte cause efectos tóxicos. Por esta razón se prefiere el uso de un solo enantiómero en el tratamiento terapéutico.

Es posible obtener IFA's enantiopuros mediante fuentes naturales, a través de síntesis química y mediante la separación de mezclas racémicas utilizando métodos fisicoquímicos y físicos. En esta última destacan las técnicas de cristalización, donde es posible formar nuevas fases sólidas ingresando auxiliares quirales GRAS (generalmente reconocidos para consumo humano por la FDA) dentro de la red cristalina del IFA quiral; para esto se toma en cuenta que exista un reconocimiento molecular entre los grupos funcionales de los componentes para que el material cristalino quede constituido por dos o más moléculas unidas por enlaces no covalentes y tenga una estequiometría definida.

Con esta técnica se obtienen combinaciones co-cristalinas o salinas que asemejan entidades diastereoisoméricas que contienen al IFA y que posee propiedades físicas y químicas diferentes en comparación con los enantiómeros, lo que permite su separación mediante métodos convencionales.

Estos temas son la base del proyecto de maestría que se presenta en este manuscrito. Una revisión profunda se desarrolla en la sección de antecedentes y posteriormente se presenta la hipótesis que sustenta a este proyecto de investigación. Los resultados, discusiones y conclusiones presentan el efecto de los procedimientos realizados sobre la posible separación quiral de los enantiómeros del fármaco de trabajo.

2 Antecedentes

2.1 Quiralidad

En 1893, William Thomson estableció el término quiralidad como la propiedad de un objeto si no es superponible con su imagen especular.¹

La palabra quiral, del griego *cheir*, significa mano y es utilizada para describir aquellos objetos no superponibles, como las manos, puesto que la mano derecha y la mano izquierda son imágenes especulares una de la otra y no es posible superponer una encima de la otra, pues sus puntos característicos no coinciden (Figura 1).²

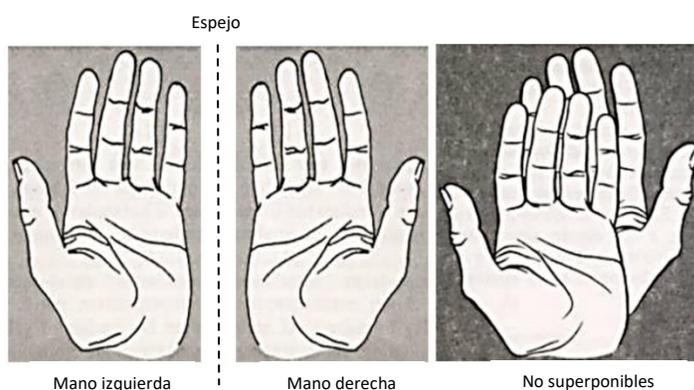
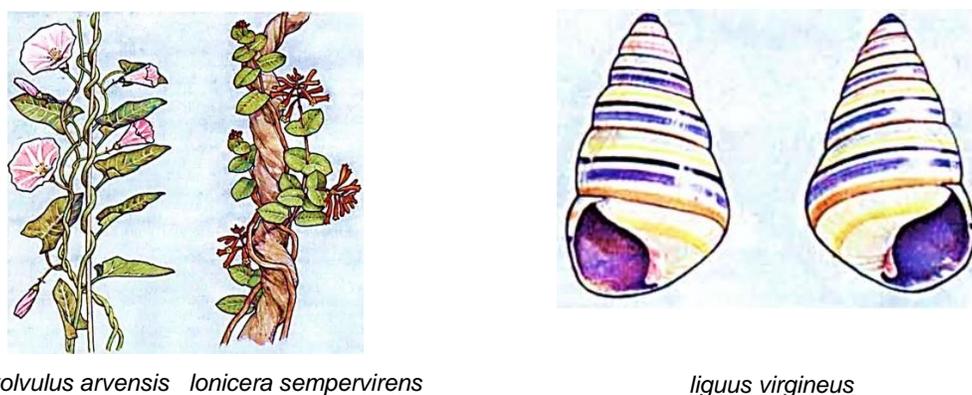


Figura 1. Las manos como objetos quirales.

En la naturaleza existen diferentes manifestaciones de la quiralidad, como las plantas trepadoras *Lonicera sempervirens* y *Convolvulus arvensis* que crecen de manera helicoidal hacia la izquierda y a la derecha, respectivamente. Mientras que, el caparazón de los caracoles *Liguus virgineus* forma una hélice hacia la derecha y en especies con mutaciones la hélice se orienta hacia la izquierda (Figura 2).³



convolvulus arvensis *loniceria sempervirens*

liguus virgineus

Figura 2. Quiralidad en la naturaleza. Imágenes tomadas de la referencia 3.

2.1.1 Quiralidad molecular

En química una molécula es quiral si las dos formas de su imagen especular no son superponibles. La IUPAC establece que un átomo de carbono tetraédrico que lleva cuatro sustituyentes diferentes sea referenciado como centro de quiralidad (Figura 3).⁴

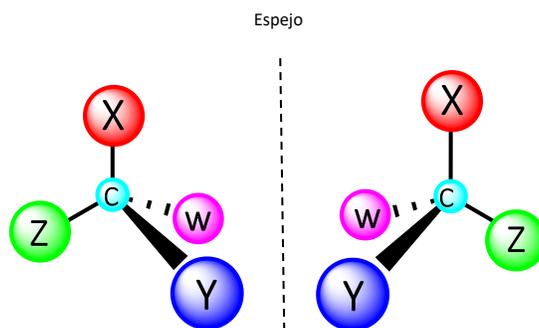


Figura 3. Representación de un compuesto con un centro quiral y su imagen especular. (modificado de la referencia 5).

2.1.2 Estereoisómeros y descriptores quirales

El estereoisomerismo se refiere a la constitución estructural que tienen los componentes unidos a un centro de quiralidad,⁵ es decir, los estereoisómeros poseen la misma fórmula molecular pero se diferencian en el arreglo espacial de los sustituyentes que se encuentran unidos a cada átomo de carbono quiral.^{6,7} Cada estereoisómero cuenta con una determinada configuración que caracteriza la disposición de sus átomos. A continuación, se presentan algunos de los descriptores quirales que se usan actualmente.

2.1.2.1 Descriptor de Cahn-Ingold-Prelog (CIP)

La nomenclatura R/S es la más utilizada, esta le da orden de prioridad a los sustituyentes que están unidos al centro de quiralidad.^{8,9} Para asignar la descripción CIP se debe basar en los siguientes criterios respecto al carbono quiral:

- 1) La prioridad la tiene el sustituyente con el número atómico o la masa atómica más alta.
- 2) Si el átomo próximo de dos o más sustituyentes es el mismo, se da preferencia al número atómico del siguiente átomo.
- 3) Si hay enlaces dobles o triples, se cuentan como si fueran dos o tres enlaces simples, respectivamente.
- 4) El enlace *cis* tiene mayor prioridad que el *trans*.

- 5) Los pares de electrones libres se consideran como un átomo con número atómico 0.
- 6) Los grupos proximales tienen mayor prioridad que los grupos distales.

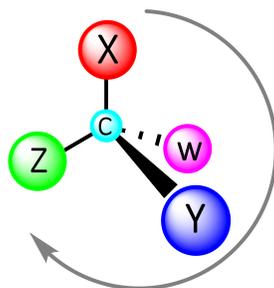


Figura 4. Orden de prioridad de acuerdo con el sistema CIP en un carbono quiral.

A partir del sistema quiral de la figura 4, el sustituyente con la menor prioridad (W) está orientado hacia atrás y los otros tres grupos se organizan en el sentido de las agujas del reloj, asignando un orden de prioridad $X > Y > Z$, entonces la configuración absoluta del C será R; y si es en contra, la configuración absoluta se definiría como S.

2.1.2.2 *Descriptor de Fischer*

En 1891, Emil Fischer, propuso un sistema de descripción que, concretamente, se utiliza para describir los cuatro sustituyentes de un carbono quiral y se puede utilizar para describir la configuración de los carbohidratos y aminoácidos. El sistema propuesto está basado en la configuración absoluta del carbono quiral del gliceraldehído (tanto L como D); los enantiómeros de los compuestos quirales que tienen una configuración parecida a la del L-gliceraldehído se designa como L (como los L-aminoácidos) y cuando se relaciona a la configuración del D-gliceraldehído se designa como D (como los D-carbohidratos). Entonces la descripción D y L solo se refiere a la configuración de los cuatro sustituyentes que rodean al carbono quiral y no está relacionada a la capacidad óptica de la molécula quiral.^{8,10}

2.1.2.3 *Descriptor +/- o d/l*

Cuando la sustancia tiene la capacidad de rotar la luz polarizada en el plano se dice que esta tiene actividad óptica, si la muestra desvía la luz hacia la derecha es *dextrorrotatorio* (*d*) y su descripción relativa será (+); sin embargo, si lo hace hacia la izquierda se dice que es *levorrotatorio* (*l*) y se describe como (-). Cuando la actividad óptica es nula se simboliza (*dl*) o (\pm). Cabe destacar que, la nomenclatura *d/l* ya no es muy utilizada, sin embargo, aún se puede encontrar en alguna bibliografía.^{8,9} Dentro de la familia de los estereoisómeros se encuentran los enantiómeros y los diastereoisómeros.

2.1.3 Enantiómeros

Los enantiómeros poseen la misma fórmula química, las mismas propiedades físicas y químicas, solo difieren en su acomodo espacial y la rotación óptica. Para cualquier par enantiomérico, la rotación óptica es de la misma magnitud, pero con signo contrario. Como se mencionó en el apartado 2.1.2.3, el signo de la rotación óptica se emplea para describir la presencia de actividad quiral. Cuando una molécula quiral tiene un solo centro quiral, y siguiendo el descriptor CIP, los enantiómeros se asignarán como R o S. Cuando la molécula quiral tiene dos o más centros quirales entonces la relación de pares enantioméricos dependerá de la asignación R o S de cada centro quiral de forma individual (Figura 5).^{8,11}

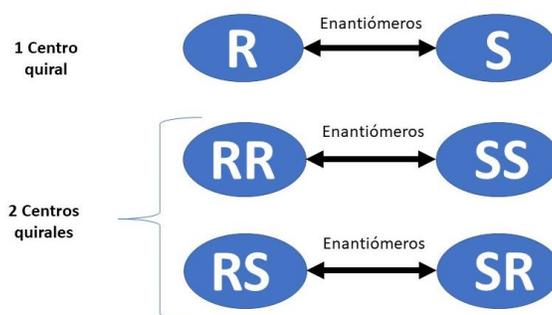


Figura 5. Relación de pares enantioméricos.

Cuando nos referimos a una sustancia enantiopura significa que todas las moléculas del material poseen la misma configuración quiral.^{2,12}

2.1.4 Diastereoisómeros

Los pares de moléculas que tienen dos o más centros quirales se denominan diastereoisómeros cuya asignación R/S no son opuestas en cada centro y no todos son superponibles entre sí. La figura 6 muestra una representación de relaciones enantioméricas y diastereoisoméricas entre una molécula hipotética que posee dos centros quirales.

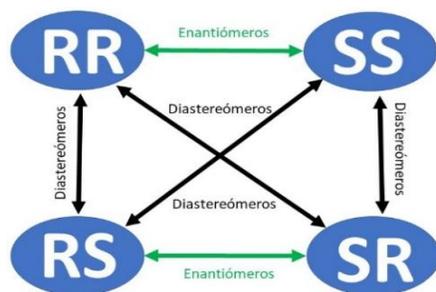


Figura 6. Diastereoisómeros con asignación CIP (modificado de la referencia 13).

Generalmente, los diastereoisómeros exhiben propiedades físicas y químicas diferentes, a diferencia de los enantiómeros; por ello, si una mezcla que contiene enantiómeros requiere ser separada, entonces lo conveniente es una transformación a diastereoisómeros que permitirá su separación mediante métodos convencionales.^{8,11,14}

2.1.5 Mezcla Racémica: racemato y conglomerado

Una *mezcla racémica* es aquella que contiene en cantidades equimolares de dos enantiómeros opuestos y no posee actividad óptica.⁸ Esta definición es general y aplica en soluciones líquidas y en sólidos. Sin embargo, en fase sólida, es indispensable distinguir dos casos particulares de cristalización (Figura 7):

- 1) *Racemato*, es un cristal que contiene cantidades equimolares de dos enantiómeros opuestos dentro de la celda cristalina.
- 2) *Conglomerado*, en donde cada cristal está formado únicamente por moléculas del mismo enantiómero.¹¹

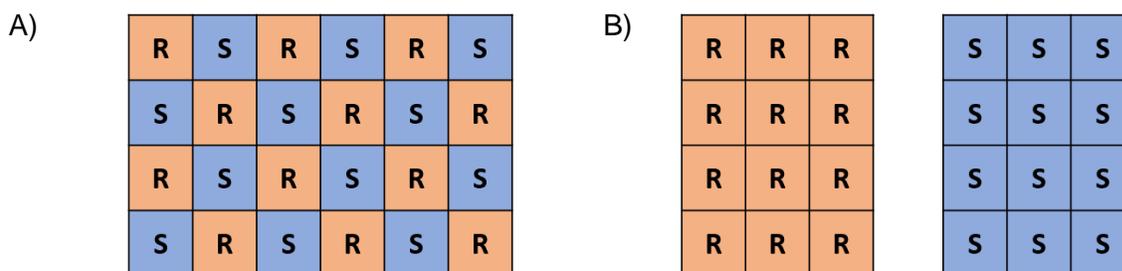


Figura 7. Representación esquemática de: A) racemato y b) conglomerado (tomado y modificado de la referencia 11)

Un ejemplo de cristalización en racemato es el ácido tartárico que en su red cristalina contiene a ambos enantiómeros (figura 8a). Por otro lado, L. Pasteur en 1848 logró resolver los enantiómeros del tartrato de amonio sódico de forma manual, puesto que cristaliza en conglomerado obteniendo cristales enantiomorfos, donde las facetas

hemiédricas de los cristales estaban inclinadas hacia la derecha y la izquierda, reconociendo que los dos cristales estaban relacionados entre sí como las dos manos (figura 8b).^{7,15-17}

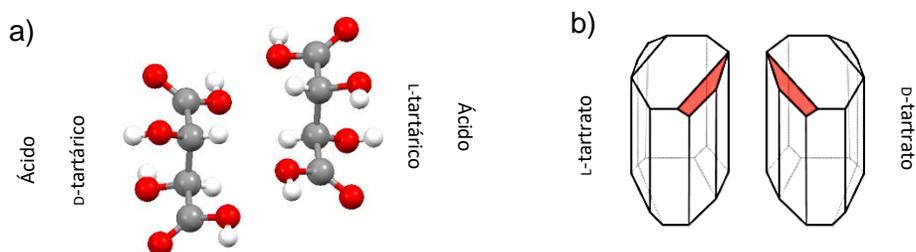


Figura 8. a) Racemato de ácido D-(2S,3S)- y L-(2R,3R)-tartárico y b) conglomerado de L y D tartrato de amonio sódico. Tomado de CCDC (Deposition Number: 1475949) y analizado en mercury®.

2.1.6 Homoquiralidad en sistemas biológicos

Las moléculas esenciales, aminoácidos y carbohidratos, que constituyen a los organismos vivos son quirales. Sin embargo, en la naturaleza los aminoácidos aparecen con la configuración L, mientras que los carbohidratos se presentan con la configuración D. Esta prevalencia de una sola configuración quiral se denomina *homoquiralidad* y es típica de la naturaleza en este planeta y se cree que fue un requisito indispensable para el origen de la vida.^{1,15,18,19}

El reconocimiento molecular es específico para los procesos bioquímicos. Algunas proteínas especializadas (enzimas) catalizan reacciones biomoleculares esencialmente por su estructura tridimensional (alfa hélice) que está formada por secuencias de L-aminoácidos. Mientras que los ácidos nucleicos, tanto en ADN como el ARN, están compuestos por subunidades que solo contienen un D-carbohidrato (ribosa o desoxirribosa) que, estructuralmente forman hélices inclinadas hacia la derecha. Esta manifestación quiral se refleja en las estructuras tridimensionales y es fundamental para acoplarse eficientemente y así lograr la replicación de los ácidos nucleicos mediante proteínas.^{3,20-22}

Un ejemplo sensorial, donde podemos apreciar la diferencia en la configuración de dos enantiómeros ópticos mediante el olfato, es con la carvona, pues el enantiómero R-(-)-carvona (obtenida del aceite de menta verde) huele a menta y para el enantiómero S-(+)-carvona (obtenido del aceite de alcaravea) se percibe un olor a comino.^{23,24} Mientras que, el compuesto que caracteriza el aroma de las frutas cítricas es el limoneno, el R-(+)-

limoneno se encuentra presente en la cascara de naranja y le proporciona ese olor. Sin embargo, su contra parte, el S-(-)-limoneno, le da el olor característico al limón.^{25,26}

2.2 Fármacos quirales

Desde principios de la civilización, se han utilizado compuestos quirales como agentes terapéuticos en remedios naturales, muchos de ellos se utilizaban como extractos de plantas en lugar de principios activos purificados. Las actividades biológicas son exclusivas de una sola configuración; sin embargo, la mayoría de los fármacos quirales se desarrollan como mezclas racémicas cuando tienen pocos efectos adversos. Sin embargo, se prefiere y sugiere el uso de un enantiómero puro cuando: a) solo uno es el responsable del efecto terapéutico, b) si uno presenta efectos adversos o c) si los dos enantiómeros presentan efectos farmacológicos diferentes.^{15,16,27}

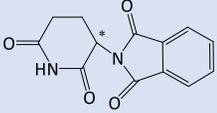
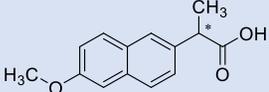
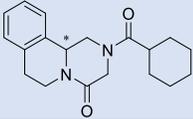
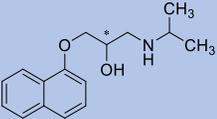
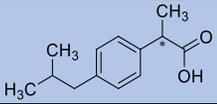
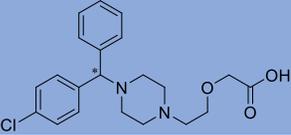
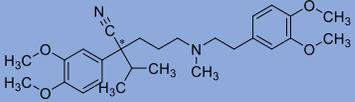
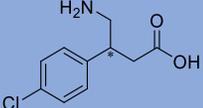
Lo acontecido con talidomida es un ejemplo del caso b. Este fármaco fue sintetizado como racemato por el Dr. Wilhem Kunz en 1953 para las compañías Ciba y Chemie Grunenthal de Suiza y Alemania, respectivamente. Después de dos años de experimentación en monas, conejas y perras embarazadas se presentaron los informes del fármaco como inocuo y sin efectos secundarios, por lo que fue aprobado para el tratamiento en seres humanos por las autoridades alemanas.²⁸

Se comercializó principalmente en Europa y Canadá, utilizado para el tratamiento de síntomas del embarazo como: ansiedad, insomnio, náuseas y vómitos. Fue retirado del mercado europeo a principios de los años 60, porque provocó graves efectos teratogénicos, descubriéndose que uno de los enantiómeros, la (S)-talidomida, producía efectos teratogénicos mientras que la (R)-talidomida aliviaba los malestares en las mujeres embarazadas.

La talidomida no fue aprobada en los Estados Unidos por la FDA por falta de pruebas de seguridad en embriones humanos. Esta tragedia fue el punto de partida para aplicar los conceptos de seguridad y farmacovigilancia en fármacos, movilizand o la legislación sanitaria a nivel mundial.^{29,30}

La tabla 1 ejemplifica diferencias en el efecto farmacológico por el uso de diversos fármacos enantiopuros.

Tabla 1. Diferencias farmacológicas entre fármacos quirales.

	Fármaco	Estructura	Configuración quiral	Uso/Categoría	Efecto farmacológico ^{8,11,30-47}
Efecto toxicológico	Talidomida		R	Sedante/Eutómero	Terapéutico
			S	Anticancerígeno/Eutómero	Quimioterapia/Teratogénico
	Naproxeno		R	Distómero	Hepatotóxico
			S	Analgésico y antiinflamatorio/Eutómero	Enantiómero activo
	Praziquantel		R	Antihelmíntico/eutómero	Enantiómero activo
			S	Distómero	Enantiómero inactivo
Diferencia en potencia	Propranolol		R	Antihipertensivo/eutómero	El enantiómero S es 40 veces más potente que el R.
			S		
	Ibuprofeno		rac	Antipirético, analgésico y antiinflamatorio/ no aplica	Enantiómero S es más potente que el R. La racemización endógena impide la comercialización de solo un enantiómero.
Diferente efecto terapéutico	Cetirizina		R	Antihistamínico /eutómero	El enantiómero R (levocetirizina) es más potente. Es posible administrar la mezcla racémica
			S	Antihistamínico de poco o nulo efecto/distómero	
	Verapamil		R	Modificador de la resistencia a múltiples fármacos en la quimioterapia/eutómero	Terapéutico
			S	Terapia cardiovascular /eutómero	Terapéutico
	Baclofeno		R	Tratamiento de la espasticidad en esclerosis múltiple/eutómero	Terapéutico
			S	Distómero	Actividad antagonista al enantiómero R

Debido a que existen fármacos enantioméricos con propiedades farmacológicas diferentes, se pueden tener diferentes opciones respecto a su posible efecto:

- 1) Que el efecto de ambos enantiómeros sea el mismo, pero que uno sea más eficaz que el otro.
- 2) Que ambos enantiómeros tengan efectos diferentes, pero que ambos sean terapéuticos.
- 3) Que un enantiómero sea un agente terapéutico efectivo, pero que su contraparte tenga efectos secundarios indeseados y/o tóxicos.
- 4) Que uno tenga un efecto terapéutico y que el otro enantiómero sea inocuo para el organismo.

Consecuente a eso, al enantiómero activo y que realiza el efecto terapéutico, se le llama eutómero. Mientras que al enantiómero poco activo, inefectivo o que causa los efectos indeseados es denominado distómero.³¹

Las agencias regulatorias son las encargadas de vigilar el control de fabricación de los productos farmacéuticos en formas enantiopuras o de mezcla racémica mediante evaluaciones toxicológicas, farmacológicas y clínicas para, finalmente, proporcionar las especificaciones como: potencia, calidad y pureza del producto terminado desde el punto de vista estereoquímico.³² Por las razones antes mencionadas es necesario el control sobre estos fármacos. Sin embargo, en México no hay una legislación que sea específica y adecuada respecto a los estudios de bioequivalencia de fármacos quirales.³³

2.3 Técnicas de obtención de moléculas enantiopuras

Las moléculas enantiopuras se pueden obtener de fuentes naturales a través de la síntesis química o mediante la separación de mezclas racémicas utilizando métodos físicos.

2.3.1 Síntesis asimétrica

La síntesis asimétrica es el método más utilizado para la producción de moléculas enantioméricamente puras. En esencia, se trata de la producción de una sustancia quiral enantiopura a partir de un sustrato orgánico proquiral utilizando auxiliares quirales durante el proceso de síntesis. Un auxiliar quiral es una entidad molecular que se une

covalentemente al sustrato proquiral y genera un efecto de impedimento estérico que orientará la formación preferente de un enantiómero.

En este tipo de reacciones se combinan el sustrato y el auxiliar quiral para inducir la asimetría en el sitio de reacción y crear moléculas diastereoisoméricas (figura 9). El auxiliar quiral es una molécula diseñada con una configuración quiral determinada con la intención de poder inducir quiralidad específica.

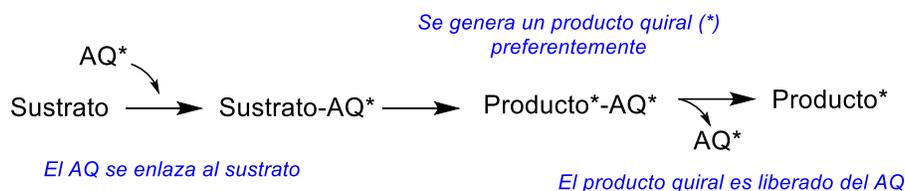


Figura 9. Representación esquemática de una síntesis asimétrica.

Con el objetivo de obtener un mayor rendimiento y pureza óptica, para este método de preparación se han diseñado diferentes auxiliares quirales que se utilizan en diferentes tipos de reacción, como: las hidrogenaciones asimétricas que actúan en el doble enlace C=C (en alquenos), C=O (en cetonas) o C=N (en iminas). O diferentes tipos de reacciones asimétricas como: oxidación, reducción o sulfoxidación, entre otras.^{8,16} Los auxiliares quirales son eficaces y versátiles; sin embargo, esta vía sintética tiene un alto costo de producción e impacto ambiental, aunque actualmente se busca minimizarlo aplicando principios de química verde.³⁴

2.3.2 Resolución enzimática

Los organismos vivos son enantioselectivos y esto es debido a las enzimas que son capaces de distinguir la quiralidad en los sustratos. La biocatálisis o síntesis enzimática es uno de los métodos más eficientes para la resolución estereoselectiva de enantiómeros mediante el uso de células o a partir de enzimas aprovechando la gran especificidad hacia la configuración particular del sustrato y obtener moléculas ópticamente puras.^{8,16}

Para lograr la biotransformación del producto de interés se requiere que las enzimas o microorganismos, i.e. *Candida antarctica* y *E. coli* recombinante,^{35,36} estén bajo condiciones óptimas de síntesis y logren un rendimiento adecuado de producción. Mediante la biocatálisis es posible crear nuevos centros quirales, siendo esta una estrategia eficiente para realizar síntesis enantioespecíficas complejas y así obtener moléculas con más de 2 centros quirales, i.e. antivirales o antibióticos.³⁶

Cuando se introduce una enzima, en cantidades biocatalíticas, en la síntesis de compuestos enantiopuros, se reducen los pasos y se sustituye el uso de disolventes que pueden ser peligrosos para la salud debido a que las enzimas catalizan en medios acuosos (por fermentación), lo que permite reutilizarse durante varios ciclos de producción y reducir el impacto ambiental.^{37,38}

A partir del conocimiento del genoma de los organismos utilizados para la síntesis enzimática ha sido posible diseñar organismos con funciones biológicas modificadas capaces de mejorar el rendimiento de fármacos e incluso producir nuevos agentes terapéuticos.^{10,16}

2.3.3 Cristalización tradicional

Esta técnica de síntesis para obtener cristales implica el uso de una mayor cantidad de los disolventes. Consiste en solubilizar los componentes del cristal deseado hasta la saturación o muy cerca de ella y permitir la evaporación lenta del disolvente hasta obtener cristales. Durante el proceso de cristalización se produce la unión de manera no covalente de las moléculas en dos etapas: la nucleación primaria, que consiste en la formación de los primeros núcleos cristalinos en la solución saturada y la nucleación secundaria, en que los núcleos primarios crecen hasta que el analito alcanza la concentración de equilibrio. En principio, al disminuir lentamente el volumen del disolvente la concentración de los solutos aumenta y el acercamiento entre los componentes permite la formación de interacciones.^{15,39} En esta técnica se debe considerar el tiempo de reacción, pues cada disolvente se evapora de manera distinta y se prolonga la síntesis del cristal.

2.3.3.1 Co-cristalización

Un co-cristal es un material cristalino constituido por dos o más compuestos, sólidos en estado puro, con una relación estequiométrica definida y unidos por enlaces no covalentes; los puentes de hidrógeno se observan comúnmente en este tipo de estructuras. Para la síntesis de la nueva fase sólida (NFS) se toman en cuenta que exista un reconocimiento molecular y posteriormente ocurra la unión complementaria entre los grupos funcionales de los componentes. El conjunto de grupos funcionales que establecen la unión de los componentes se denomina *sintón supramolecular*. Las principales interacciones intermoleculares ocurren entre los grupos funcionales: ácidos carboxílicos, amidas, aminas y alcoholes, que actúan como donadores y aceptores de

puentes hidrógeno. Estos pueden formar los sintones supramoleculares en la síntesis de co-cristales que se muestran en la figura 10.^{40,32}

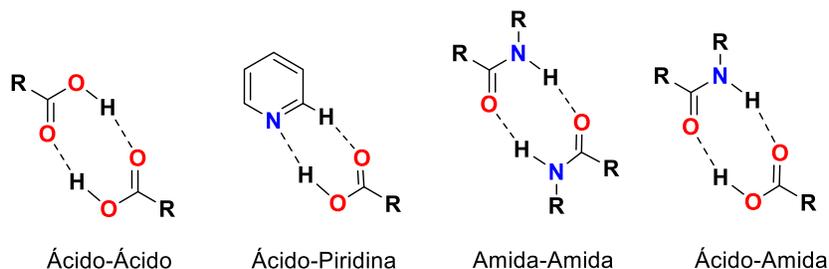


Figura 10. Sintones supramoleculares empleados en la formación de co-cristales. Se conoce como homosintón cuando se produce la interacción de grupos funcionales similares en las moléculas complementarias y heterosintón cuando la interacción está formada por grupos funcionales diferentes.⁴⁰

Cuando uno de los constituyentes es un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) y hay al menos un formador de co-cristal o co-formador, se define como co-cristal farmacéutico. Los co-cristales se puede obtener tanto por métodos en solución como métodos en estado sólido.³³

En este proyecto se utilizaron las técnicas de co-cristalización por slurry (RxS), molienda seca (RxM NG) y asistida con gotas de disolvente (RxM SD); que, principalmente usan menor cantidad de disolvente para llevar a cabo la reacción de síntesis.

2.3.3.1.1 Co-cristalización por slurry

La técnica de co-cristalización por slurry es un método que consiste en la transformación de fase mediado por la solución, en la cual se agrega la cantidad necesaria del disolvente adecuado y obtener una sobresaturación de la mezcla física de los componentes del co-cristal hasta formar una sustancia con apariencia de pasta,^{43,44} se mantienen en agitación leve a un tiempo determinado para permitir el reconocimiento intermolecular de los grupos funcionales de los componentes y formar los sintones supramoleculares que formarán al co-cristal.⁴⁵⁻⁴⁷

2.3.3.1.2 Co-cristalización por molienda

2.3.3.1.2.1 Molienda en seco

El método de molienda en seco o libre de disolvente, neat-grinding (NG, por sus siglas en inglés), es un método de síntesis mecanoquímica en estado sólido que se utiliza para obtener co-cristales en donde, los componentes se pueden moler manualmente utilizando un mortero y un pistilo o automáticamente usando un molino de bolas vibratorio. El

método de molienda NG evita la incorporación de moléculas de disolvente en la red cristalina de los componentes y no formar solvatos. Además, la síntesis de co-cristales mediante este método elimina la producción de los desechos y residuos de disolventes, siendo de esta manera amigable con el medio ambiente (química verde).^{39,40,48} Las técnicas mecanoquímicas (en seco y con disolvente) son eficientes y rápidas para la selección del segundo componente para la generación de co-cristales farmacéuticos.⁴⁹

2.3.3.1.2.2 Molienda asistida por disolvente

Una modificación a la técnica de molienda en seco es la molienda asistida por disolvente (SD por sus siglas en inglés), *solvent drop grinding*. Esta técnica consiste en agregar algunas gotas de un disolvente adecuado durante el proceso de molienda para facilitar la producción de co-cristales. La adición de gotas del disolvente mejora el rendimiento de la síntesis, además de que funciona como catalizador en la reacción,^{48,50,51} incluso, algunos autores mencionan que la cantidad racionalizada del disolvente puede controlar el polimorfismo en ciertos materiales.⁵²

2.3.3.1.3 Cristalización enantioselectiva

La cristalización enantioselectiva es una estrategia de co-cristalización que se basa en la incorporación de componentes sólidos dentro de la fase cristalina que, en este caso, se aplica enantioselectivamente utilizando aditivos quirales como co-formadores para la resolución quiral de los IFA's racémicos (figura 11). El producto podría obtenerse de dos diferentes maneras.^{35,69-70}

1. A partir de un co-formador enantiopuro con grupos funcionales adecuados para que, selectivamente, interaccione y se forme una red cristalina solo con el enantiómero diana de la mezcla racémica.
2. Que se formen los co-cristales de cada enantiómero de la mezcla racémica con su respectivo co-formador enantiopuro y de esta manera se obtendrían un par de co-cristales diastereoisoméricos.

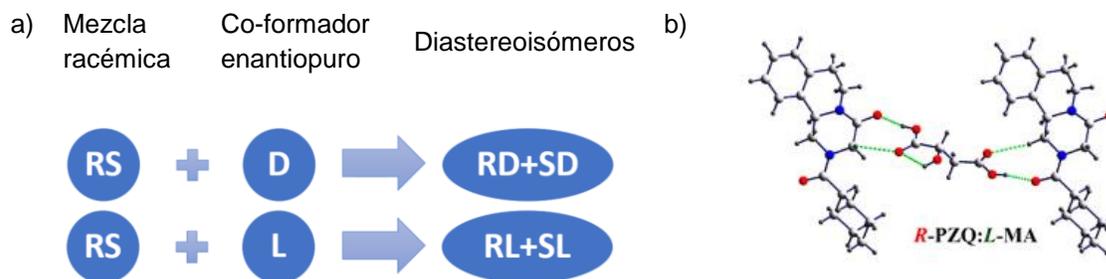


Figura 11. a) Representación esquemática de la obtención de diastereoisómeros a partir de una mezcla racémica y un co-formador enantiopuro. b) co-cristal de R-PZQ:L-Mal obtenido a través de la metodología similar al inciso a (tomado y modificado de la referencia 52).

Los diastereoisómeros tienen propiedades fisicoquímicas diferentes, como el punto de fusión o la solubilidad, así que, un par de co-cristales diastereoisoméricos pueden ser separados mediante técnicas convencionales como la diferencia de solubilidad, por ejemplo R-PZQ:L-Mal.^{53,56}

Los co-formadores enantiopuros o auxiliares quirales utilizados en los experimentos de co-cristalización pueden ser las sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS por sus siglas en inglés) aprobadas por la FDA para consumo humano.⁵⁷

2.4 Técnicas de elucidación/detección de moléculas quirales

En este apartado se describen las principales técnicas para detectar moléculas quirales. Estas técnicas también son útiles en la elucidación de NFS o moléculas nuevas de uso farmacéutico.

2.4.1 Difracción de rayos X de polvos

La difracción de rayos X de polvos (DRXP) nos proporciona una caracterización de la estructura cristalina de las moléculas que la conforman; esta herramienta es capaz de identificar modificaciones en la red cristalina, por lo que es la primera elección cuando se requiere analizar polvos farmacéuticos en cualquiera de sus formas cristalinas: polimorfos, co-cristales, sales, solvatos o hidratos.^{40,58}

También se recurre a esta técnica cuando el material cristalino no forma cristales de tamaño y calidad suficiente para establecer la estructura cristalina. La DRXP es una técnica de análisis rápido y es complementaria a la difracción de rayos X de monocristal.⁵⁹ Para el análisis de polvos farmacéuticos, la DRXP nos proporciona el patrón de difracción

de los materiales de partida y nos permite compararlos con el producto para indagar si existen cambios en la red cristalina que nos puedan dar indicios de una NFS.⁴¹

La técnica de DRXP no distingue la configuración quiral de las sustancias enantioméricas, sino solo detecta los cambios en la red cristalina que se ven reflejados en el patrón de difracción. Así que, se debe entender que las diferencias en los difractogramas pueden ocurrir en dos casos particulares: 1) en muestras de material enantiopuro y 2) en materiales que contienen una mezcla de componentes enantioméricos (mezcla racémica).

En el primer caso, supongamos un material enantiopuro R, y que existen dos polimorfos. En consecuencia a la simetría quiral, debe existir el material S en los mismos arreglos cristalinos (figura 12, cuadros rojos). Si estas 4 muestras se analizaran por DRXP, entonces aquellas que tengan la misma estructura cristalina deberán tener el mismo patrón de difracción (figura 12, recuadros azules). Mientras que aquellos que tienen estructuras cristalinas distintas, aun siendo enantiómeros, tendrán difractogramas distintos (figura 12, flechas verdes).

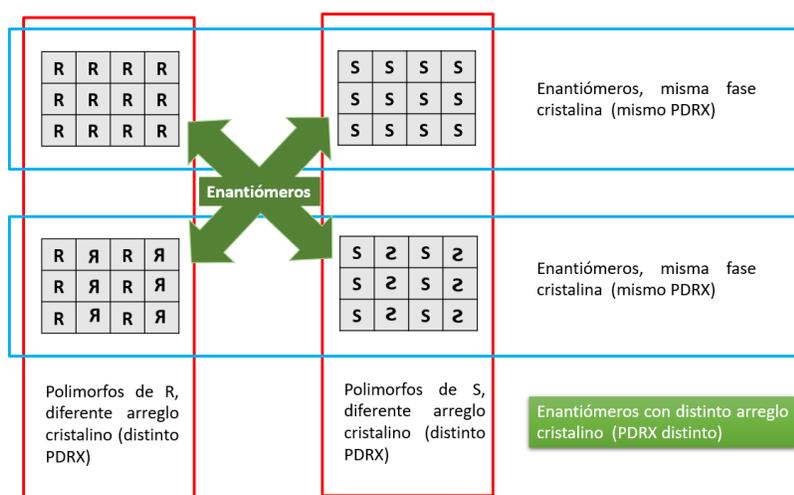


Figura 12. Relación de cristalización de enantiómeros. Recuadros azules: pares de enantiómeros, recuadros rojos: pares de polimorfos y flechas verdes: enantiómeros con distinto arreglo cristalino.

En el segundo caso, cuando se tiene una mezcla racémica la apariencia del difractograma de polvos depende de su naturaleza: Racemato o Conglomerado. De acuerdo con la figura 8a, en el racemato cada molécula R interactúa intermolecularmente con al menos una molécula S generando una estructura racémica. Por tanto, el difractograma de un material racémico (figura 13a) será distinto al material enantiopuro. Para el conglomerado (figura 8b) cada partícula del material contiene solo un enantiómero y, por tanto, se

comporta como una mezcla física de los sólidos enantiopuros tal que el difractograma de un conglomerado será idéntico a los enantiopuros (figura 13b y c).

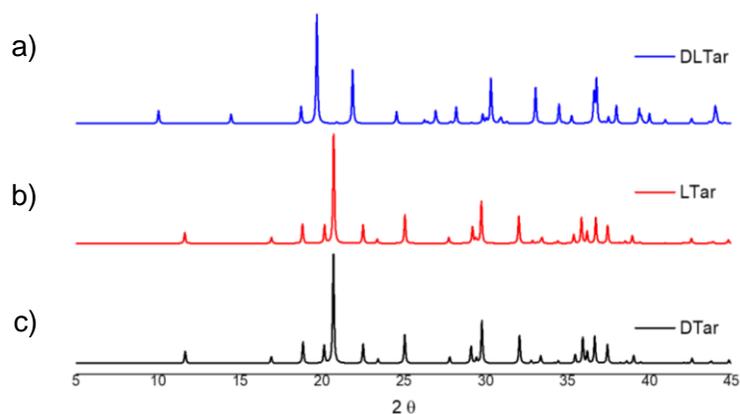


Figura 13. Difractogramas de: a) DLTar, b) LTar y c) DTar. Datos tomados de CCDC (códigos ZZZDui02, TARTAL04 y TARTAC), extraídos con Mercury® 3.8 y esquematizados con Origin® 9.

2.4.2 Polarimetría

La polarimetría es uno de los métodos más utilizados para caracterizar las sustancias quirales, es capaz de proporcionar el grado de pureza quiral de las sustancias enantioméricas y se usa para complementar la descripción de moléculas quirales. Como se explicó en el apartado 2.1.2.3, los enantiómeros tienen la propiedad física de girar el plano de la luz polarizada con la misma magnitud, pero en direcciones opuestas.^{8,16}

Este fenómeno sucede cuando se hace pasar un haz de luz polarizada plana a través de una solución que contiene una muestra enantiopura, pues la interacción con las moléculas desvía el haz, mientras que, los parámetros de orientación y magnitud dependen de la configuración quiral de dichas moléculas; sin embargo, el signo de la rotación (+ o -) no está asociado a la configuración absoluta R o S.⁹

La rotación específica, $[\alpha]_{\lambda}^T$, es la rotación observada por unidad de concentración y longitud del paso de luz, como se muestra a continuación:⁶

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

Donde:

T = Temperatura (°C)

λ = Longitud de onda

α = Rotación observada en condiciones dadas

l = Longitud del paso de luz

c = Concentración (g/mL)

El instrumento empleado para la medición es el polarímetro (figura 14) y nos proporciona el resultado en grados ($^{\circ}$). Para que la $[\alpha]_{\lambda}^T$ sea constante es necesario fijar la longitud de onda de la luz empleada, la temperatura de disolución y el disolvente empleado. Entonces, una sustancia enantiopura, posee una rotación específica y su contraparte tendrá la misma rotación, pero en sentido contrario, este valor es único y se utiliza para caracterizar sustancias enantiopuras. En cambio, la mezcla racémica (50:50), tiene una rotación específica de cero, pues el efecto de la molécula dextrorrotatoria es anulado por la molécula levorrotatoria.^{6,60}

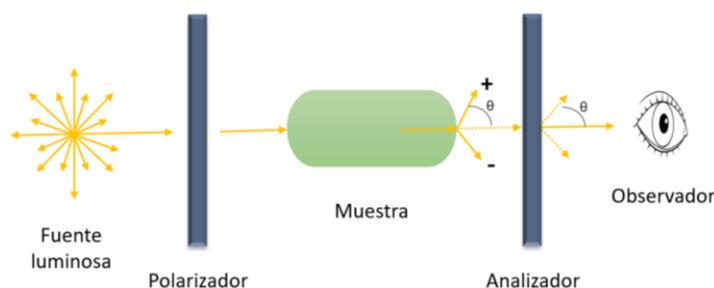


Figura 14. Representación esquemática de un polarímetro. Líneas sólidas: antes de la rotación, líneas punteadas: después de la rotación, α es el ángulo de rotación (Adecuado de la referencia 6).

Desde el descubrimiento de las diferencias en las propiedades farmacológicas de los enantiómeros de uso farmacéutico, el uso de esta técnica se ha vuelto importante para la investigación en química orgánica y en la caracterización de fármacos enantiopuros.⁶¹

2.4.2.1 Polarimetría utilizando placas polarizadas

Como se comentó en la sección 2.1, la quiralidad se expresa macroscópicamente. Diversos grupos de trabajo han investigado sobre el rompimiento de la simetría quiral para la obtención de moléculas enantiopuras.^{20,62} En el caso particular de la cristalización de clorato de sodio (NaClO_3), que a pesar de no ser una molécula quiral, se pueden obtener cristales ópticamente activos en conglomerado o mayormente orientados hacia alguna configuración, L o D, cuando se controla la velocidad de agitación del medio. Para que se lleve a cabo el rompimiento de la simetría quiral se requieren de dos pasos. El primero a nivel microscópico con la creación de los primeros núcleos cristalinos (L o D) con la orientación quiral establecida durante su formación, y el segundo paso implica el crecimiento de esos núcleos cristalinos ya formados. La agitación actúa como acelerador en el crecimiento de los cristales y orienta la preferencia quiral, es decir, agitar en el sentido de las manecillas del reloj produce una orientación quiral y la agitación en contrasentido produce la orientación quiral opuesta.⁶³⁻⁶⁵

Las moléculas en solución son aquirales y cuando estas llegan al núcleo primario ocurre la nucleación secundaria con la morfología quiral ya establecida por la nucleación primaria y la agitación es quien facilita este crecimiento.⁶⁶

Cuando los cristales de NaClO_3 crecen a un tamaño adecuado, se pueden diferenciar a través de un par de placas polarizadas y al girar una de las placas, los cristales orientados hacia alguna configuración específica, L o D, se tornarán de un color (u opacarían el paso de la luz) y los que tengan la orientación opuesta serán de otro color (o serían claros al dejar pasar la luz polarizada),^{18,53,57} como se demuestra en la imagen 1, donde se hizo girar la placa superior por 45° y 135° .

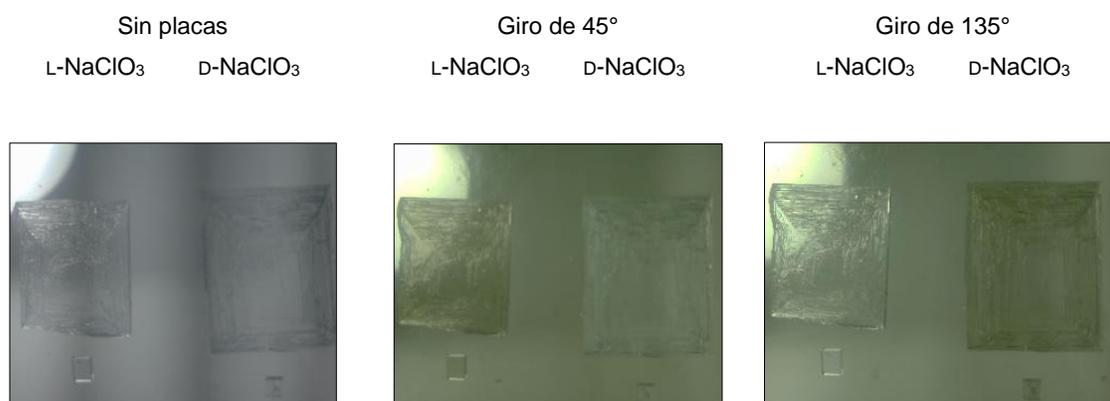


Imagen 1. Cristalización del Clorato de sodio, forma Izquierda: L- NaClO_3 y forma Derecha D- NaCl_3

La técnica de cristalización, el manejo de los filtros polarizados y los cristales que se muestran en esta imagen se realizó bajo la asesoría del Dr. José Manuel Cruz Martínez y del Dr. Thomas Buhse (Centro de Investigaciones Químicas, UAEM).

2.5 Guaifenesina

Guaifenesina (Guai) se utiliza para el alivio sintomático de los trastornos respiratorios caracterizándose por su acción expectorante que, incrementa el volumen de las secreciones bronquiales y estimula la acción ciliar para su eliminación mediante la deglución o expulsión. Desde el punto de vista clínico los efectos adversos ocurren con poca frecuencia (diarrea, mareos, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, rash cutáneo y dolor estomacal).⁶⁹⁻⁷² Se han emitido alertas por parte de la FDA específicamente dirigidas hacia los registros legales para la venta de medicamentos y a la importación de productos farmacéuticos en Estados Unidos que contienen este principio activo.⁷³⁻⁷⁵ Guaifenesina es un fármaco quiral y hasta ahora no se han emitido alertas sobre su uso

terapéutico, este fármaco forma parte de productos farmacéuticos aprobados por la FDA.⁷⁶

2.5.1 Estructura cristalográfica de Guaifenesina

Guaifenesina racémica (*rac*-Guai) posee dos grupos OH y cada uno es capaz de generar dos puentes de hidrógeno (figura 15a), de manera tal que, para formar una cadena unidireccional como la que se muestra en la figura 15b, el grupo OH terminal (OH_t) de una molécula interactúa con el grupo OH quiral (OH_q) de otra molécula mientras que el OH_t de esta va a interactuar con el grupo OH_q de la siguiente molécula y así sucesivamente.

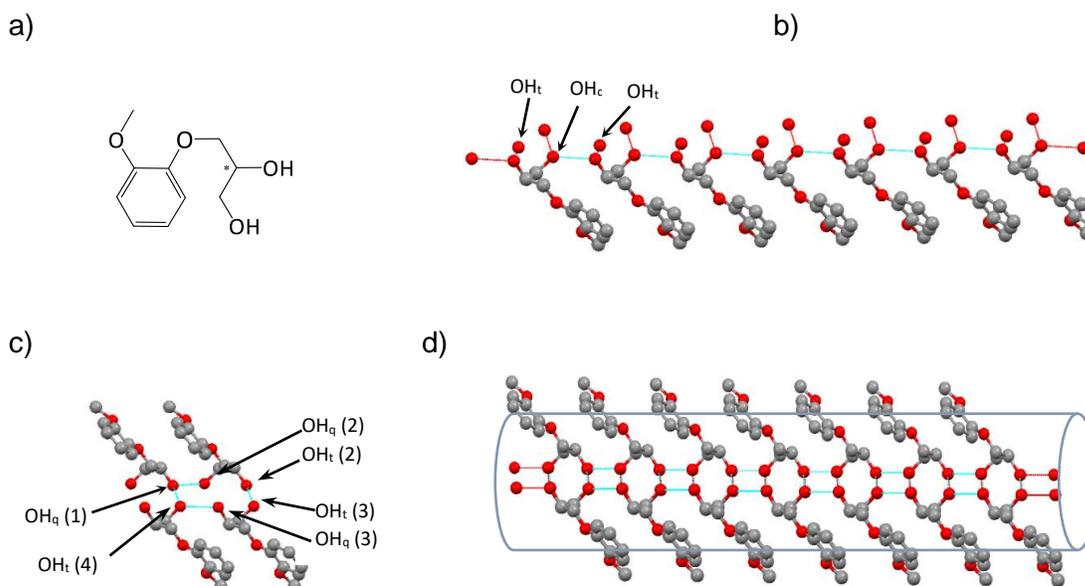


Figura 15. Estructuras moleculares y cristalográficas de: a) guaifenesina, b) cadena unidireccional de guaifenesina c) sintón de guaifenesina y d) estructura tubular de guaifenesina. Tomado de CCDC (Deposition Number 693625) y analizado en mercury®.

Para formar el sintón supramolecular (figura 15c), la cadena se une con los puentes de hidrógeno restantes de la cadena vecina, es decir, una vez que el OH_t de la molécula (1) interactúa con el OH_q de la molécula (2), el OH_t (2) se enlaza con el OH_t de la molécula (3), que a su vez, se va a enlazar por medio de su grupo OH_q con el OH_t de la molécula (4), mismo que interacciona con el grupo OH_t (1), creando así la estructura cristalina propuesta en la figura 15d. Cabe destacar que los grupos éter no participan en la formación de puentes de hidrógeno de esta estructura.

2.5.2 Otros usos de Guaifenesina

El enantiómero (S)-Guai es precursor en la síntesis de otros Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA's), tales como los relajantes musculares levomoprolol, metocarbamol y mefenoxalona (figura 16).⁷⁷

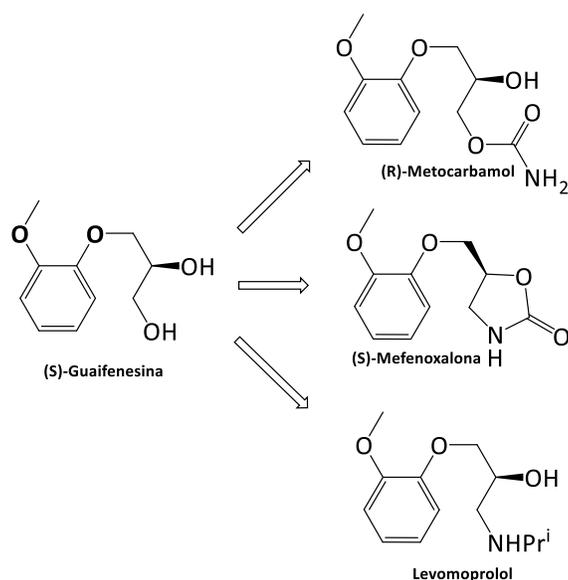


Figura 16. Guaifenesina como precursor de otros IFA's.⁹²

Para utilizar una de las formas enantiopuras de *rac*-Guai, como precursor de estos IFA's, diferentes autores aprovecharon su naturaleza de precipitar en conglomerado a partir de una cristalización inducida por una semilla (o partículas de un material ópticamente puro que permita el crecimiento) de (S)-Guai o (R)-Guai, según se requiera. En el procedimiento, a una solución sobresaturada de la mezcla racémica se le adicionan semillas cristalinas del enantiómero deseado hasta que se produce la precipitación del mismo enantiómero. Por medio de filtración, los cristales se recuperan y las aguas madres quedan saturadas del enantiómero contrario. En un ciclo posterior, usando semillas del otro enantiómero, es posible la obtención de cristales del otro enantiómero.⁷⁸

Esta técnica ha mostrado ser sensible a los cambios de temperatura que afectan a la velocidad de precipitación. Adicionalmente, esta técnica requiere de las formas enantiopuras de Guai para realizar la inducción de la cristalización.

3 Justificación

Entre los enantiómeros de un fármaco quiral es posible que existan diferencias farmacológicas. Lo ideal es administrar solo el enantiómero con el efecto terapéutico deseado (eutómero).

La generación de sales diastereoisoméricas es un método convencional en la resolución quiral. Sin embargo, pocos ejemplos se han reportado de co-cristales diastereoisoméricos. En nuestro caso utilizamos guaifenesina racémica (*rac*-Guai) como modelo para la resolución enantiomérica considerando sus cualidades estructurales que no le permiten generar sales, pero si interacciones de puente de hidrógeno. Estas interacciones facilitarían el reconocimiento por algún aditivo quiral.

En este proyecto se buscó un método de separación de (S)- o (R)-Guai, utilizando aditivos quirales que conduzcan a la resolución mediante una cristalización dirigida por interacciones intermoleculares.

4 Hipótesis

A partir de guaifenesina racémica, bajo un screening de disolventes y técnicas de preparación de NFS, se obtendrá la resolución enantiomérica mediante una cristalización enantioselectiva con aditivos GRAS quirales seleccionados.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Separar los enantiómeros de la mezcla racémica de Guaifenesina a través del desarrollo de un método de cristalización preferencial quiral.

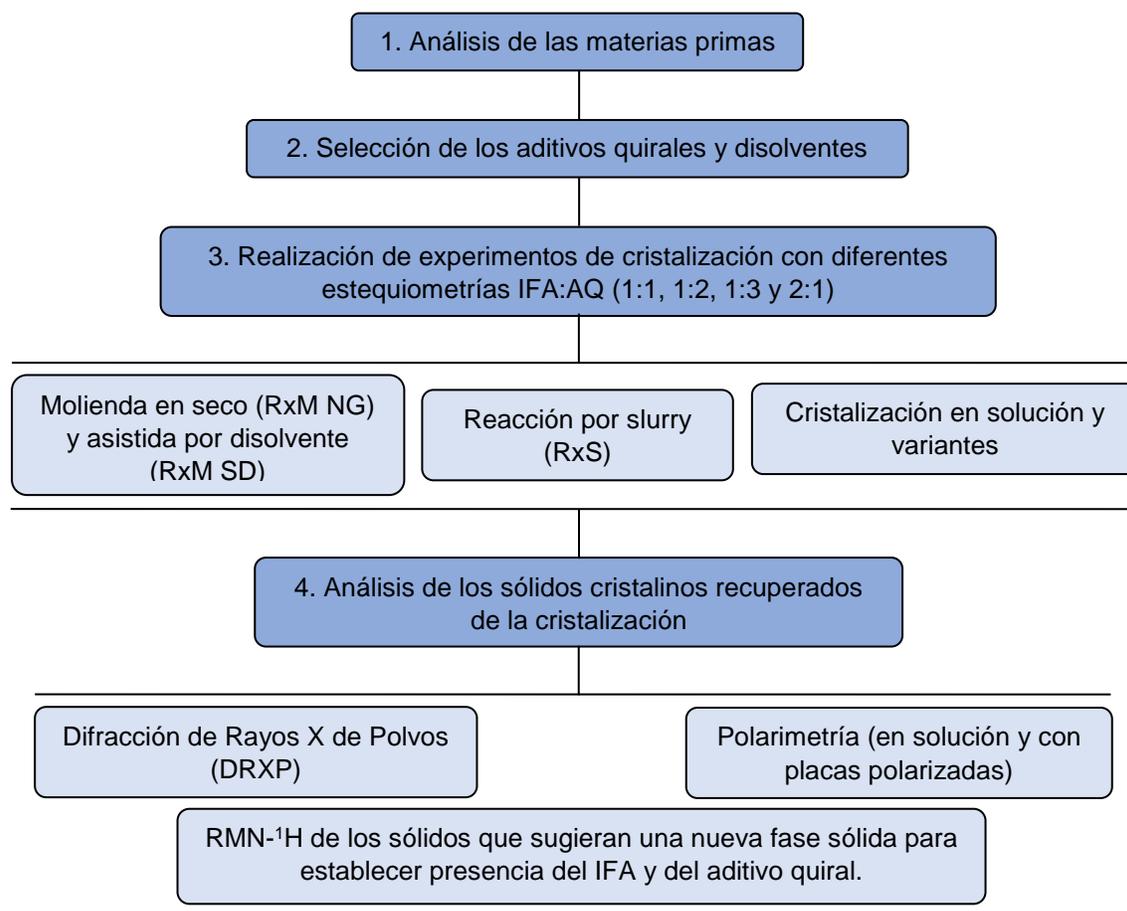
5.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los disolventes orgánicos y los aditivos quirales bajo el criterio de que sean capaces de establecer posibles puentes de hidrógeno de manera enantioselectiva con el fármaco de interés.
- Establecer las condiciones experimentales de molienda mecánica y reacción de slurry que conduzcan a una nueva fase sólida diastereoisomérica entre las materias primas.
- Realizar experimentos de cristalización en solución líquida bajo los criterios de la miscibilidad entre los disolventes, la solubilidad de las materias prima sólidas y la proporción de volúmenes para aislar cristales de un solo enantiómero del IFA.
- Caracterizar los sólidos obtenidos de cada proceso de preparación por difracción de rayos X de polvos para detectar posibles nuevas fases sólidas, RMN-¹H para identificar sus componentes y polarimetría para determinar posibles excesos quirales.

6 Procedimientos

6.1 Diagrama general de trabajo

En el siguiente diagrama se muestra el procedimiento que se siguió para la realización de este proyecto.



6.2 Materiales y Equipos

Materias primas:

Reactivos	Proveedor	Lote	CAS
Guaifenesina	Sigma-Aldrich®	SLBP2756V	93-14-1
Ácido D-Málico	Sigma-Aldrich®	BCBM2329V	636-61-3
Ácido L-Málico.	Sigma-Aldrich®	1377675	97-67-6
Ácido DL-Málico	Aldrich-Chemistry Reagent Plus®	MKBS7851V	6915-15-7
Ácido L-Aspártico	Sigma-Aldrich®	SLBB8906V	56-84-8
Ácido D-Aspártico	Aldrich-Chemistry Reagent plus®	MKBS50510V	1783-96-6
Ácido L-(+)-Tartárico	Sigma Aldrich®	BCBQ5657V	87-69-4
Ácido D-(-)Tartárico	Aldrich Reagent plus®	08411DEV	147-71-7
Ácido DL-Tartárico	Aldrich Reagent plus®	MKBS0401V	133-37-9

Disolventes:

Agua destilada	Etanol	Metanol
Acetona	Acetato de Etilo	Hexano
Diclorometano	Cloroformo	

Equipos de laboratorio:

Equipo:	Marca:	Modelo:
Balanza analítica	OHAUS CORPORATION®	PA214
Termo-agitador	IKA®	C-MAG HS7
Bomba de vacío	BUCHI®	V-100
Difractómetro de rayos X de polvos	Bruker®	D2 Phaser
Horno	THELCO LABORATORY®	130M
Baño seco	CORNING®	6785-DB
RMN- ¹ H.	BRUKER®	400 MHz
Molino	Retsch®	MM400

6.3 Métodos de preparación de nuevas fases sólidas

En esta sección se describen los métodos de obtención de NFS utilizados en este proyecto de investigación para la obtención de moléculas diastereoisoméricas o co-cristales utilizando aditivos quirales como agentes de co-formadores.

6.3.1 Reacción de Molienda (RxM)

Los experimentos de co-cristalización por molienda se realizaron en un molino de bolas vibratorio (descrito en el apartado de equipos de laboratorio). Esta técnica fue de primera elección ya que utiliza la menor cantidad de disolvente o nada de este.

Para realizar la molienda en seco (RxM NG) se pesan las materias primas (MP) en proporción estequiométrica del Ingrediente Farmacéutico Activo y de Aditivo Quiral (IFA:AQ) para formar 0.1 g de NFS; la mezcla se coloca dentro de un contenedor de acero inoxidable (con una capacidad de 1.5 mL), al cual se le adiciona una posta también de acero inoxidable. Los componentes se molieron durante 30 min a 25 Hz.

Para realizar las reacciones por molienda asistida por disolvente (RxM SD), se sigue el mismo procedimiento que la RxM NG, pero en esta técnica se agregan dentro del contenedor algunas gotas del disolvente seleccionado (ca 50 μ L) justo antes de moler los componentes.

Al término, se recupera el polvo obtenido de cada experimento, tanto de las RxM NG como de RxM SD, se deja secar a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se analizaron por DRXP.

6.3.2 Reacción slurry (RxS)

Con el fin de aumentar la cantidad de disolvente, se contempló realizar un conjunto de experimentos de RxS con los disolventes seleccionados inicialmente. El experimento de RxS consiste en pesar los materiales de partida en cantidades estequiométricas IFA:AQ para obtener 0.1 g de producto, colocarlos dentro de un vial de 3 mL, agregar el disolvente seleccionado hasta formar una pasta, mantenerla en agitación con un agitador magnético (2x7 mm) a TA durante tiempos establecidos (3, 5, 15 y 20 horas cada experimento). Al finalizar el tiempo de reacción retirar el agitador, dejar secar a TA bajo vacío, una vez seco el producto analizar por DRXP.

6.3.3 Cristalización tradicional

Se realizaron experimentos de cristalización tradicional con cada uno de los disolventes seleccionados. Esta técnica requiere de un mayor volumen de disolvente en comparación con las técnicas anteriores.

Para realizar este tipo de cristalización se agregaron las materias de partida en proporciones estequiométricas para obtener 0.1 g de producto dentro de un vial de 30 mL, se adiciona la cantidad suficiente de disolvente, o una mezcla homogénea de disolventes, hasta observar que los solutos están completamente disueltos y, posteriormente, se deja evaporar a TA el tiempo necesario hasta observar la formación de cristales o producto precipitado en el fondo del vial. Se realizó un experimento para cada mezcla de materias prima y cada disolvente. Por último, el sólido resultante de cada experimento se analiza por DRXP.

6.3.4 Variantes de cristalización

Las variantes de los experimentos de cristalización surgieron como alternativa a la cristalización tradicional.

Las variantes consisten en experimentos de cristalización bifásica, que involucran seleccionar dos disolventes inmiscibles entre ellos, pero capaces de disolver a una de las MP. El fármaco se solubiliza en un disolvente y aditivo quirál en el otro, pero manteniendo la relación estequiométrica 1:3 del IFA:AQ. En esta técnica se aplicaron dos condiciones distintas:

- a) Variante 1 (Var 1): para esta variante se pesan las MP de manera estequiométrica 1:3, *rac*-Guai se disuelve en uno de los disolventes y el AQ en el otro disolvente, hasta observar que el soluto está completamente disuelto. A la solución minoritaria se adiciona más disolvente de manera que, se obtengan volúmenes similares en los dos disolventes inmiscibles. La solución menos densa se coloca primero en el contenedor para quedar en la parte inferior del recipiente y encima se coloca la solución más densa (figura 17) para lograr la formación de una interfase entre las soluciones que contienen los componentes del cristal y de esta manera evitar la rápida evaporación de la solución más volátil. Posteriormente se deja evaporar a temperatura ambiente hasta observar la formación de cristales o precipitado en los viales.

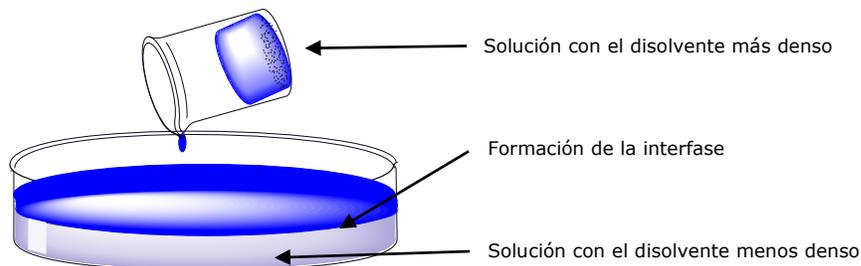


Figura 17. Representación esquemática de la variante 1.

b) Variante 2 (Var 2): Esta variante también utiliza dos disolventes inmiscibles entre ellos para disolver los solutos, pero la solución minoritaria no se compensa para equilibrar el volumen. De igual manera que la cristalización anterior, primero se coloca la solución menos densa en el contenedor y encima se coloca la solución de más densa a gotas con una pipeta de vidrio, permitiendo la formación de gotas al fondo del contenedor (figura 18). Posteriormente, se deja evaporar a TA hasta observar cristales o precipitado al fondo del contenedor.

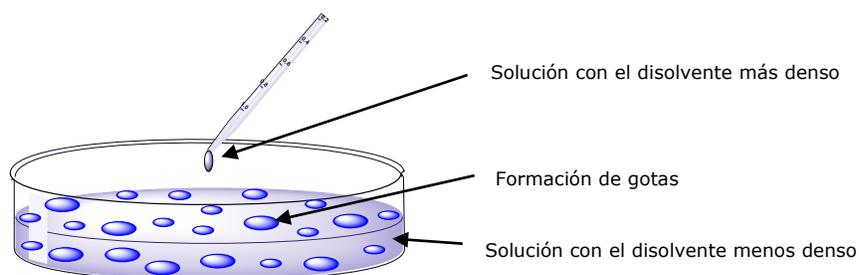


Figura 18. Representación esquemática de la variante 2.

Todos los sólidos recuperados son colocados entre placas polarizadas haciéndoles pasar un haz de luz para determinar su actividad óptica. Posteriormente se analizan por microscopía para observar su morfología y por DRXP como se menciona anteriormente en la sección 6.3.

Durante el desarrollo experimental fue necesario modificar la variante 2 en la variante 3 (Var 3) y 4 (Var 4). La diferencia en Var 3 consistió en cambiar el contenedor a un vial de 30 mL y en Var 4 se aumentaron los volúmenes de los componentes al doble conservando la estequiometría 1:3 (IFA:AQ).

6.4 Caracterización de sólidos

En esta sección se describe la manera de preparación de las muestras que se obtuvieron por cada uno de los métodos de cristalización, tanto polvos como cristales, para analizarlos por la técnica conveniente.

6.4.1 Difracción de rayos X de polvos (DRXP)

De los experimentos de cristalización por slurry y algunas cristalizaciones se obtuvieron polvos. Estos se secaron completamente a vacío, se homogenizó el tamaño de partícula con una espátula o con un mortero y pistilo sin aplicar mucha energía; una vez molida y homogenizada la muestra se tomó una cantidad de 100 mg aproximadamente para analizarlos con un difractómetro Bruker® modelo D2 Phaser. Los difractogramas adquiridos en este proyecto requirieron 22 minutos de adquisición, en un intervalo 2θ de 5 a 45° y un step de 0.016.

6.4.2 Polarimetría

Cuando se realizaron los experimentos de cristalización, que incluyen las variantes de cristalización en la interfase y el sembrado en solución descritas más adelante en la sección 6.4.4, mediante estas técnicas se obtuvieron cristales que presentaron diferente morfología que dependía de la variante de cristalización utilizada (ver sección de resultados). Los sólidos se recuperaron y se analizaron a través de un par de placas polarizadas y con el polarímetro.

6.4.2.1 Polarimetría utilizando placas polarizadas

Se creó un artefacto capaz de realizar una función similar a un microscopio petrográfico con placas polarizadas incorporadas, solo utilizando un par de placas polarizadas como se describe en las referencias 16 y 60 con el que se analizó la capacidad de interacción con la luz polarizada de los sólidos recuperados de los experimentos de cristalización. Se analizaron los cristales al hacer pasar un haz de luz a través de la muestra, se gira la placa superior en el sentido de las manecillas del reloj y se observa desde la parte superior para notar si cambian de color las muestras y establecer si un cristal contiene preferentemente una configuración quiral. Este artefacto está constituido como se indica en la figura 19.

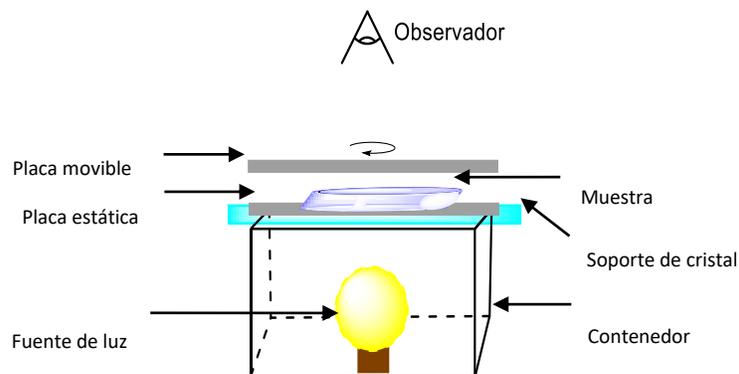


Figura 19. Artefacto utilizado para realizar el análisis a través de placas polarizadas.

Fuente de luz blanca (foco de 4 watts) contenido en el fondo de un contenedor de cartón (20x20x15 cm) con fondo blanco, un cristal transparente (20x20 cm) como soporte y un par de filtros polarizados (10x10 cm cada uno). El movimiento de la placa superior se realizó manualmente. Las placas utilizadas en este proyecto fueron donadas por el Dr. Thomas Buhse del Centro de Investigaciones Químicas, UAEM.

6.4.2.2 Polarimetría utilizando un polarímetro

Esta técnica se utilizó para analizar los sólidos obtenidos de los experimentos de cristalización tanto en la interfase como los sembrados en solución. Se recuperaron aproximadamente 5 mg de cada muestra, se transfirieron y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada en un matraz aforado, se transfirió a la celda del polarímetro descrito en la sección 6.2 y se leyeron a $\lambda = 589 \text{ nm}$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura. Para cada muestra se tomaron 10 lecturas y se calculó el promedio, debido a la variación en la respuesta del equipo.

7 Resultados y discusión

En esta sección se describen los resultados experimentales a partir de las técnicas RxM, RxS y cristalización de *rac*-Guai con los aditivos quirales y los disolventes seleccionados. En las primeras secciones se describen la selección de los AQ y disolventes. Al final se presentan los resultados experimentales de los diferentes tipos de cristalización empleados en el proyecto.

7.1 Criterios de selección de aditivos quirales y disolventes orgánicos

Se seleccionaron como AQ los ácidos: DL-málico (DLMal), D-málico (DMal), L-málico (LMal), D-tartárico (DTar), L-tartárico (LTar), D-aspártico (DAsp) y L-aspártico (LAsp) cuyas estructuras se muestran en la figura 20.

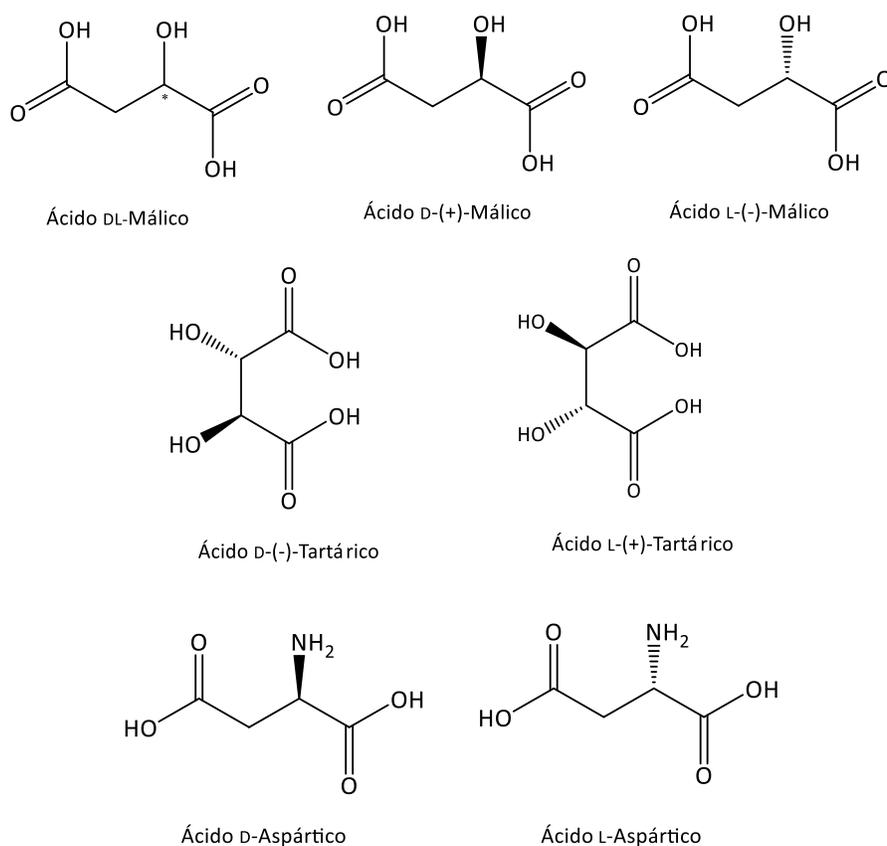


Figura 20. Estructuras químicas de los aditivos quirales seleccionados.

Ya que forman parte de la lista GRAS y poseen grupos funcionales que podrían ser complementarios para formar puentes de hidrógeno con los grupos -OH de *rac*-Guai (figura 21).

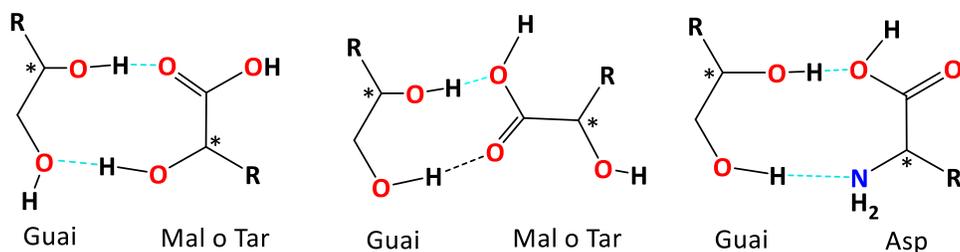


Figura 21. Posibles sintones entre *rac*-guaifenesina y los aditivos quirales seleccionados.

Con estos AQ se hace una búsqueda para la selección del que logre mejores interacciones con los enantiómeros de *rac*-Guai.

Para la selección de disolventes se consideró la polaridad como criterio principal, y adicionalmente la capacidad de formar puentes de hidrógeno; como el caso del etanol (EtOH) que posee un grupo donador y aceptor de puentes de hidrógeno mientras que la acetona (Acet) y el acetato de etilo (A. de Etilo) solo poseen un grupo aceptor de puentes de hidrógeno, y el acetonitrilo (CH₃CN) que no forma puentes de hidrógeno fuertes. También se considera la hidrofobicidad como en el caso de diclorometano (CH₂Cl₂), cloroformo (CHCl₃) y A. de Etilo (Tabla 2).

Tabla 2. Disolventes seleccionados por su capacidad de formar puentes de hidrógeno e hidrofobicidad.

Polares que forman puentes de hidrógeno	Polares aceptores de puentes de hidrógeno	Polares hidrofóbicos	Polar aceptor de puente de hidrógeno débil
$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{H}$ Metanol 33.6* $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{H}$ Etanol 25.3*	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ Acetato de etilo 6.02* $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$ Acetona 20.7*	$\text{H}-\text{C}(\text{Cl})_2$ Diclorometano 8.9* $\text{H}-\text{C}(\text{Cl})_3$ Cloroformo 4.8*	$\text{H}_3\text{C}-\text{CN}$ Acetonitrilo 36.2*

*Valores de la constante dieléctrica de los disolventes seleccionados. Valores tomados de la bibliografía 79.

7.2 Caracterización por Difracción de Rayos X de Polvos de *rac*-Guaifenesina y aditivos quirales

Las materias primas se sometieron bajo las condiciones de RxM NG, RxM SD y RxS con los diferentes disolventes seleccionados anteriormente para comprobar la estabilidad e integridad física de las MP. De manera representativa, se presentan en la figura 22, los patrones de DRXP de las materias prima bajo condiciones de slurry en los disolventes utilizados en primera instancia: etanol (EtOH) y acetona (Acet).

De manera general, todas las materias primas (*rac*-Guai y AQ) mantienen las señales representativas en el patrón de DRXP bajo las condiciones de molienda NG y SD comparados con el análisis del sólido obtenido del envase (Env) en todos los disolventes seleccionados en la sección anterior. Adicionalmente, tampoco se presentaron cambios en los difractogramas de las MP bajo condiciones de RxS en todos los disolventes, lo que significa que ninguna materia prima sufre cambios en su cristalinidad con los diferentes disolventes empleados y bajo las condiciones de cada experimento.

Con el propósito de realizar un análisis adecuado entre las materias primas y las mezclas en porciones estequiométricas en los difractogramas posteriores, se utilizarán los patrones de difracción de las materias primas que pasaron por las condiciones de RxM NG, RxM SD y RxS según se requiera.

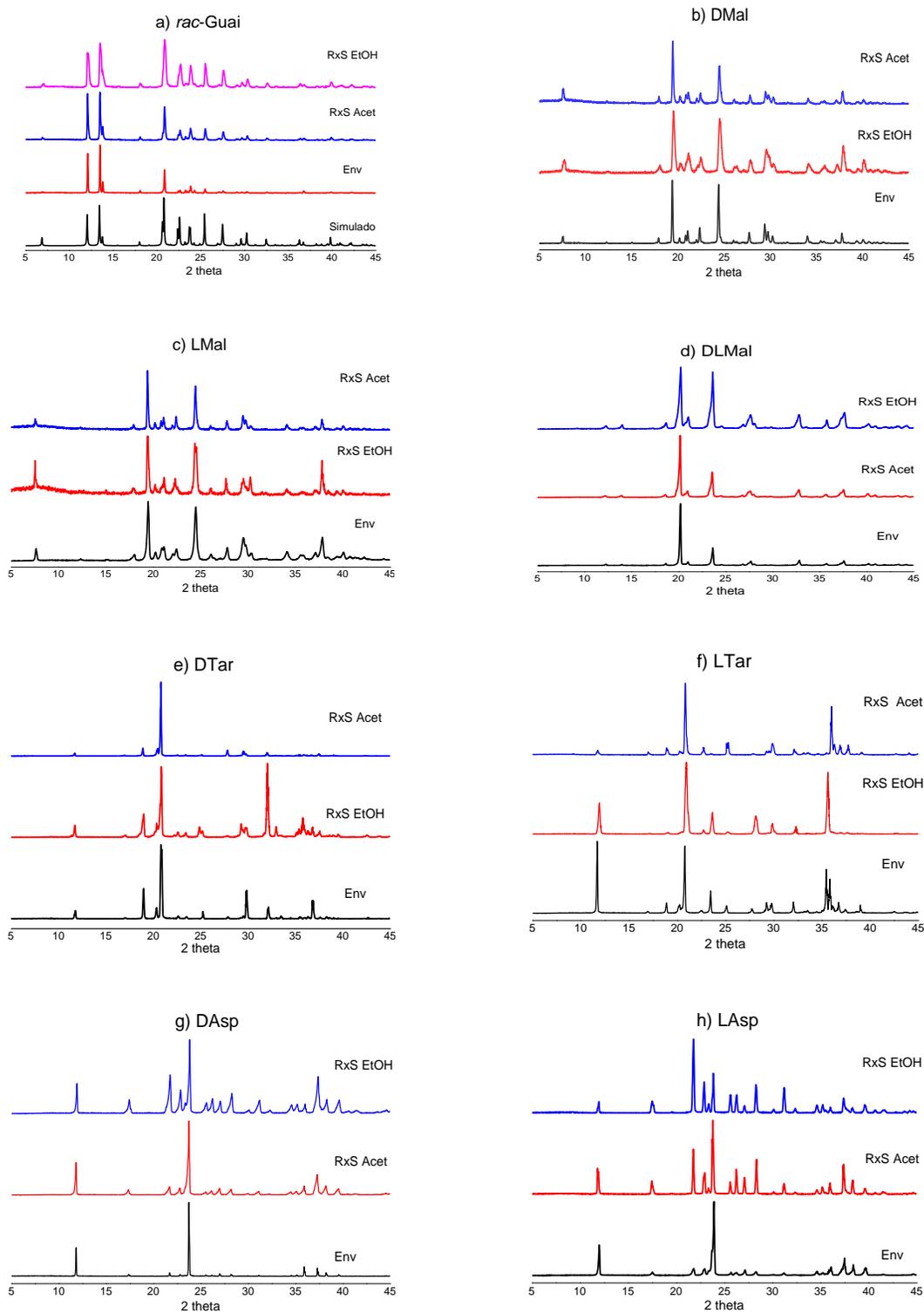


Figura 22. Patrones de difracción de las materias prima en los disolventes seleccionados bajo condiciones de slurry: a) *rac*-Guai, b) ácido D-málico (DMal), c) ácido L-málico (LMal), d) ácido DL-málico (DLMal), e) ácido D-tartárico (DTar), f) ácido L-tartárico (LTar), g) ácido D-aspártico (DAsp) y h) ácido L-aspártico (LAsp) contra el sólido directo del envase (Env).

7.3 Estudios experimentales de reacción por slurry

La exploración experimental comenzó con el uso de cantidades intermedias de disolvente mediante la reacción de cristalización por slurry (RxS) esto con la intención de observar el efecto del disolvente con las diferentes estequiometrías propuestas en el apartado de procedimientos y posteriormente analizamos los sólidos recuperados a través de los PDRX en la búsqueda de algún cambio que sugiera alguna interacción entre el IFA y el AQ.

Los estudios de RxS se realizaron utilizando *rac*-Guai con los aditivos quirales: ácidos málicos, aspárticos y tartáricos en forma enantiopura, así como algunos en forma racémica. Cabe mencionar que se preparó la mezcla racémica DLTar a partir de las formas enantiopuras del ácido tartárico a través de la solución acuosa y no se usó la mezcla física de los polvos. La tabla 3 describe los resultados obtenidos comparando la mezcla de *rac*-Guai con cada aditivo quiral, el solvente utilizado para la RxS, la relación estequiométrica empleada y si hubo indicios de una NFS mediante el análisis de DRXP.

Tabla 3. Resultados del screening por reacción de slurry.

Mezcla quiral	Disolvente	Estequiometría	Indicios de una NFS
<i>rac</i> -Guai + DMal	Acetona, etanol	1:1	No
		2:1	
<i>rac</i> -Guai + LMal	Acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, hexano e isopropanol	1:2	No
		1:3	
<i>rac</i> -Guai + DLMal	Acetona, etanol, acetonitrilo y acetato de etilo	1:1	No
		2:1	
<i>rac</i> -Guai + DAsp	Acetona, etanol, acetato de etilo	1:1	Si
		2:1	
		1:2	
		1:3	
<i>rac</i> -Guai + LAsp	Acetona, etanol, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, hexano e isopropanol	1:1	No
		2:1	
		1:2	
		1:3	
<i>rac</i> -Guai + DTar	Acetona, etanol	1:1	Si
		2:1	
<i>rac</i> -Guai + LTar	Acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, hexano e isopropanol	1:2	No
		1:3	
<i>rac</i> -Guai + DLTar	Acetona	1:3	Si
		1:4	

De acuerdo con nuestras observaciones, las combinaciones de *rac*-Guai con los ácidos málicos en forma enantiopura y racémica (D, L y DL) usando etanol como medio de reacción produjo una sustancia transparente y viscosa imposibilitando el análisis por difracción de rayos X de polvos. Mientras que, usando los demás disolventes y

combinaciones estequiométricas, el análisis de los PDRX no mostraron indicios de una NFS (ejemplo en el anexo 1). Respecto al uso de los ácidos DAsp y LAsp, en las relaciones estequiométricas indicadas con *rac*-Guai, no se observó ninguna señal nueva o cambio de patrón en el DRXP que refiera a una NFS; esto último para todos los disolventes propuestos, es decir, las señales observadas en las diferentes combinaciones estequiométricas representan una mezcla física de los componentes (ejemplo en el anexo 2).

Posiblemente se deba a que el ácido aspártico forma puentes de hidrógeno intermoleculares demasiado fuertes y que no permiten la interacción con las moléculas de *rac*-Guai (figura 23) o que en solución se encuentra en forma de zwitterión, imposibilitando la interacción con Guai.

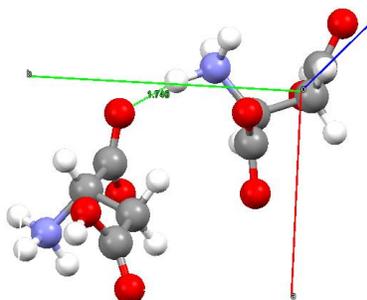


Figura 23. Puentes de hidrógeno intramoleculares del ácido aspártico. Tomado de CCDC (Deposition Number 103651) y analizado en mercury®.

Por este motivo se descartó el uso de estos aditivos quirales para la resolución enantiomérica de Guaifenesina racémica.

Posteriormente, se procedió con los experimentos de RxS de *rac*-Guai con los ácidos DTar y LTar 1:1 y 2:1 (IFA:AQ) en EtOH y Acet; los polvos recuperados se analizaron por DRXP. De acuerdo con los difractogramas, en la mezcla *rac*-Guai:DTar y *rac*-Guai:LTar 1:1, aparecieron señales nuevas además a las pertenecientes a las MP. En la combinación 2:1 no hubo señales nuevas (ejemplo de los difractogramas obtenidos en el anexo 3).

Bajo esta observación, se decidió aumentar la porción estequiométrica del AQ en los mismos medios de reacción. A continuación, se presentan los patrones de DRXP de los experimentos de RxS de *rac*-Guai con los ácidos a) DTar, b) LTar y c) *rac*-DLTar (figura 24a-c) con estequiometrías 1:1, 1:2 y 1:3 (IFA:AQ) utilizando acetona como medio de RxS.

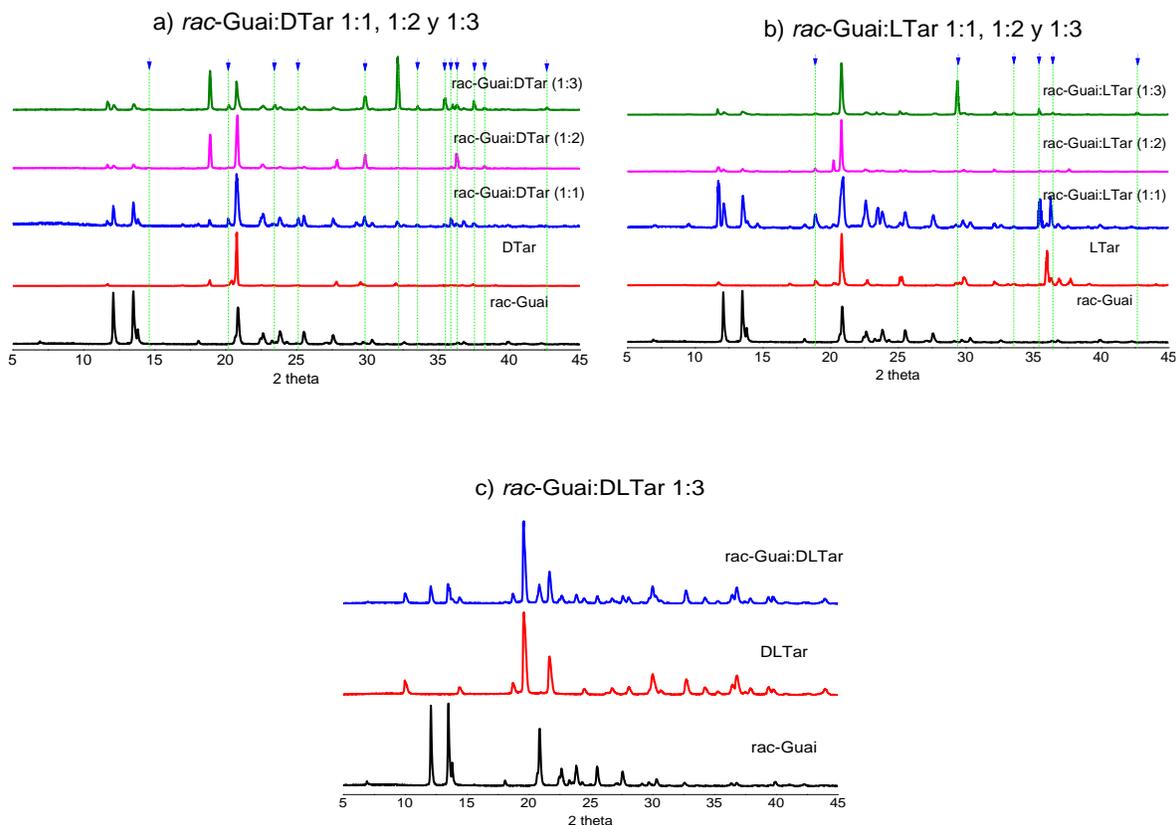


Figura 24. Patrones de DRXP de la RxS de *rac*-Guai con los ácidos a) DTar y b) LTar con estequiometrías 1:1, 1:2 y 1:3 (IFA:AQ) y c) DLTar en estequiometría 1:3 (IFA:AQ) en acetona. Las líneas punteadas son una guía visual para las señales que se modifican.

De manera general, notamos que al aumentar la cantidad estequiométrica del AQ desde 1:1 a 1:3 (IFA:AQ) aparecen nuevas señales y de mayor intensidad en comparación con las señales obtenidas de las materias prima para las combinaciones de *rac*-Guai ya sea con DTar o utilizando LTar. Sin embargo, para el experimento de *rac*-Guai con DLTar 1:3 (IFA:AQ), en la figura 24c, no se observan señales nuevas a diferencia de las mezclas con los AQ enantiopuros.

La ausencia de modificaciones en el PDRX puede ser consecuencia del comportamiento de DLTar como un racemato verdadero⁸⁰ y, por tanto, su energía de red cristalina es menor, i.e. más estable; y no permite la interacción con *rac*-Guai. Mientras que, en los experimentos con Dtar y LTar con estequiometría 1:4 (IFA:AQ) los DRXP fueron similares a los obtenidos con la proporción 1:3 (figura 25).

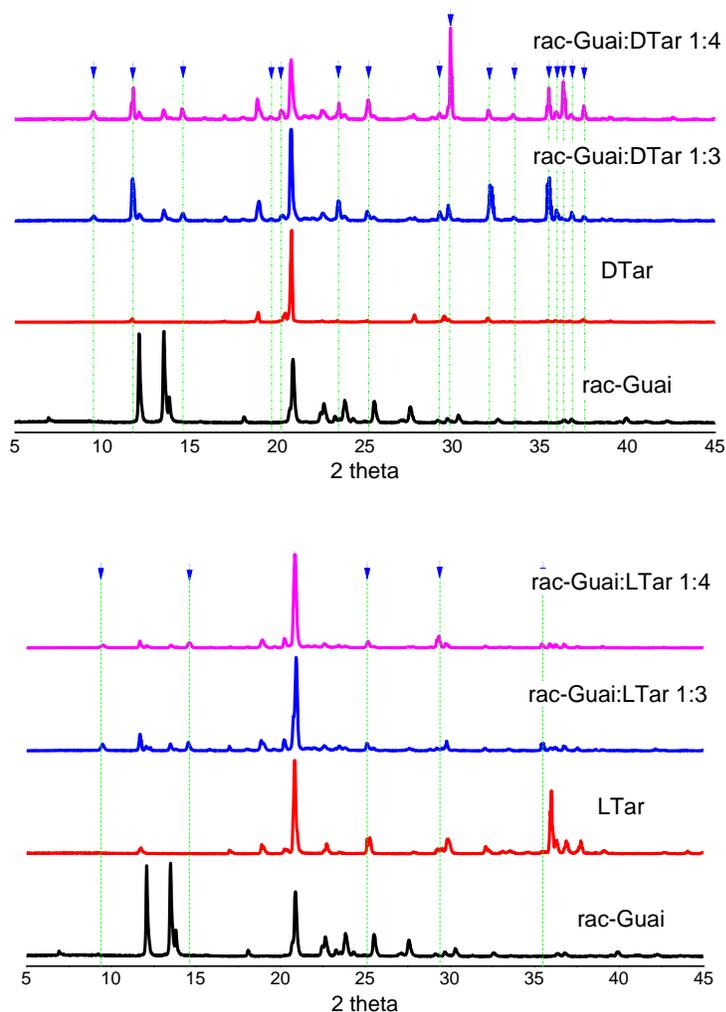


Figura 25. Patrones de difracción de a) *rac*-Guai:DTar y b) *rac*-Guai:LTar en estequiometrías 1:3 y 1:4 (IFA:AQ) comparado con las materias prima.

También se consideró que el tiempo de reacción podría ser un factor importante durante la RxS, por lo que se realizaron experimentos a 5, 10 y 20 horas con las mezclas de *rac*-Guai:DTar y *rac*-Guai:LTar (1:3) en Acet. Los resultados del análisis de DRXP se muestran en la figura 26.

De acuerdo con el análisis de los diferentes PDRX; los materiales de partida: *rac*-Guai y DTar en comparación con la mezcla *rac*-Guai:DTar (1:3), como se observa en la figura 26a, las señales pertenecientes a los materiales de partida disminuyen mientras que aparecen nuevas señales (líneas punteadas) hasta las 15 h de tiempo de reacción, pero a las 20 h las señales disminuyen probablemente a que la reacción habría llegado al punto más alto antes en este tiempo y se pierde la cristalinidad de la supuesta NFS. En cambio, los PDRX de *rac*-Guai:LTar (1:3), como se muestra en la figura 26b, también aparecen

señales nuevas con respecto al tiempo de reacción, sin embargo, las señales de las MP aún muestran una intensidad comparable con las señales nuevas.

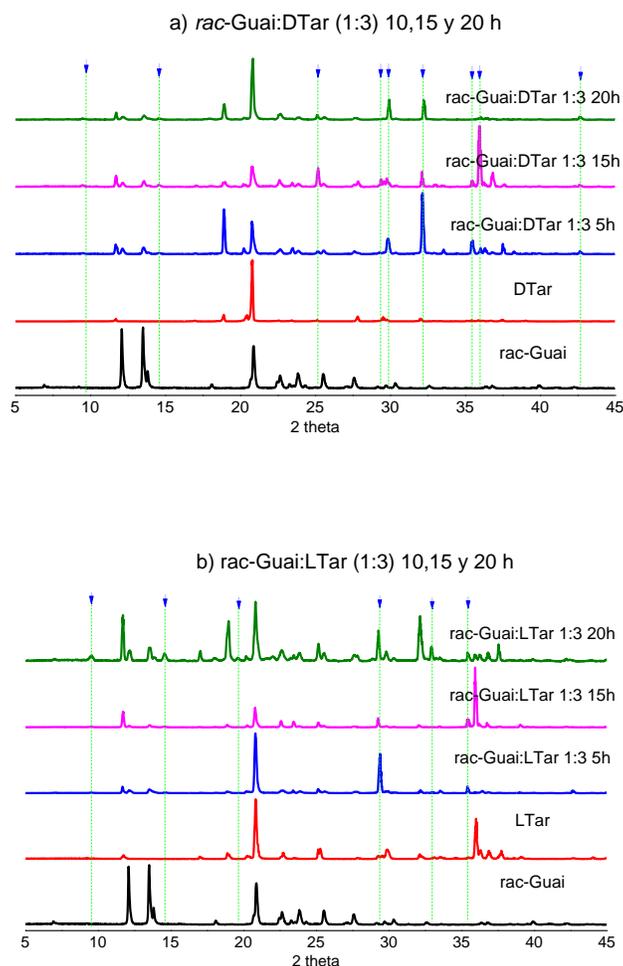


Figura 26. Patrones de difracción de a) *rac*-Guai:DTar y b) *rac*-Guai:LTar en estequiometrías 1:3 (IFA:AQ) con diferentes tiempos de reacción 5, 15 y 20 horas usando acetona como medio de reacción. Las líneas punteadas son una guía visual para las señales que se modifican.

La aparición de las señales nuevas en los experimentos de reacción por slurry marcó una pauta en la búsqueda de interacciones entre *rac*-Guai y los ácidos DTar y LTar. Al parecer el volumen de disolvente utilizado como medio de reacción es relevante, así que manteniendo la estequiometría 1:3 y con los ácidos tartáricos enantiopuros, se buscan otras técnicas de reacción para la obtención de una NFS estable como a) la molienda mecánica que requiere cantidades mínimas o ausencia total de disolvente y b) la cristalización en solución que requiere una gran cantidad de disolvente.

7.4 Estudios experimentales de reacción por molienda mecánica

Se realizaron experimentos de molienda en ausencia de disolvente (RxM NG) y con gota de disolvente (RxM SD) con las mezclas 1:3 de *rac*-Guai con los AQ: DTar y LTar. Para la RxM SD, se utilizaron los disolventes: acetona, acetato de etilo, hexano, etanol e isopropanol bajo las condiciones descritas en la sección 6.4.1 de procedimientos.

Al comparar los PDRX de las MP contra las diferentes mezclas en la RxM NG, ningún difractograma mostró señales nuevas, sino que el PDRX fue característico de una mezcla física de polvos. El resultado fue el mismo para la RxM SD en todos disolventes utilizados. Para los resultados mostrados en la figura 27, se comparan con los PDRX de las materias primas obtenidas posteriormente al proceso de molienda.

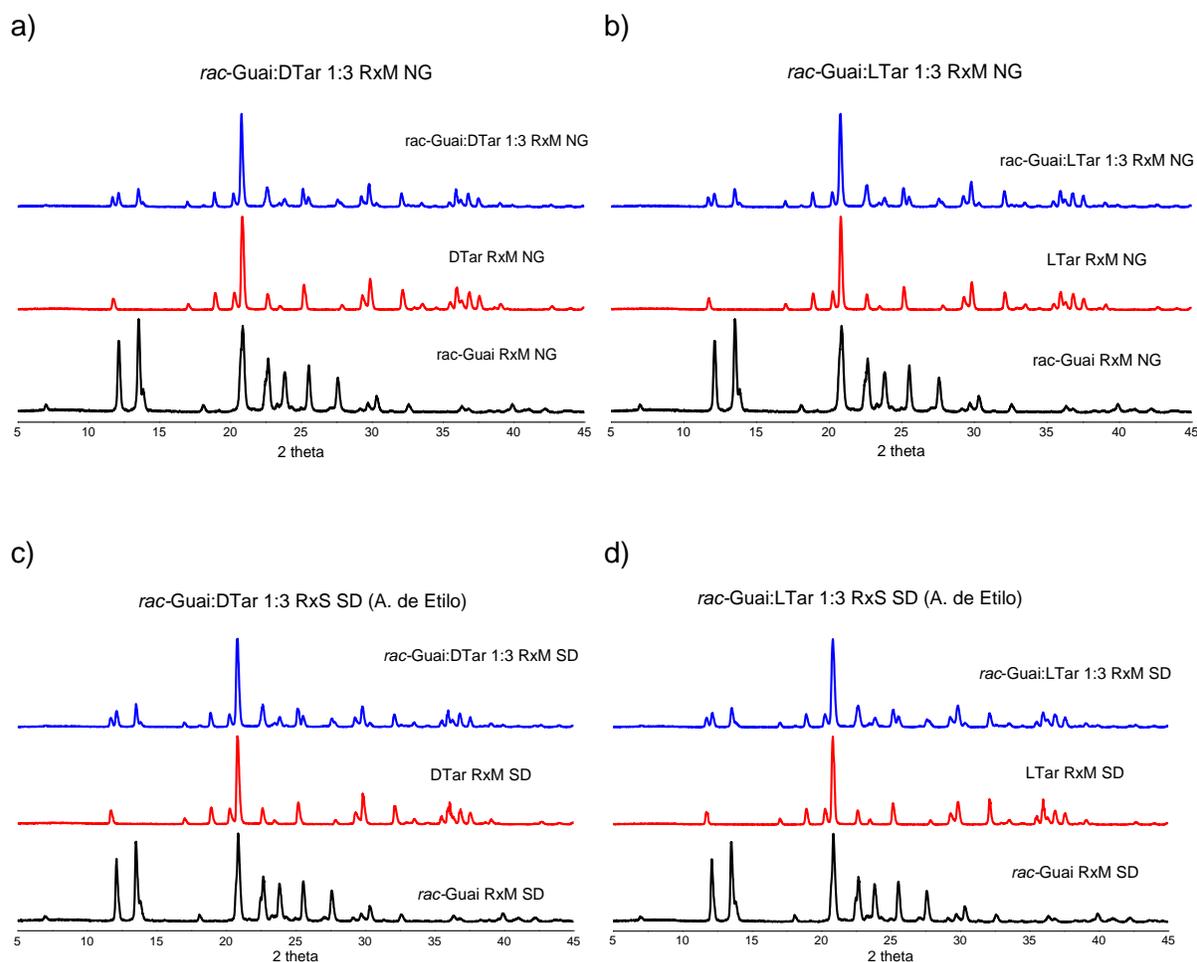


Figura 27. Difractogramas de RxM NG de a) *rac*-Guai:DTar (1:3), b) *rac*-Guai:LTar (1:3) y RxM SD utilizando acetato de etilo c) *rac*-Guai:DTar (1:3) y d) *rac*-Guai:LTar (1:3)

La figura 27 muestra la comparación de los difractogramas de RxM NG y RxM SD (acetato de etilo, como ejemplo). En ningún caso se observa la transformación del PDRX. En el anexo 4 se muestran las comparaciones con el resto de los disolventes.

Al parecer la ausencia de disolvente, o su uso en cantidades mínimas, no es capaz de generar los cambios en los PDRX de los sólidos tratados bajo RxM. De tal manera que debe ser necesaria una mayor presencia del disolvente. Este caso se presenta y analiza en la siguiente sección.

7.5 Estudios experimentales de cristalización en solución líquida

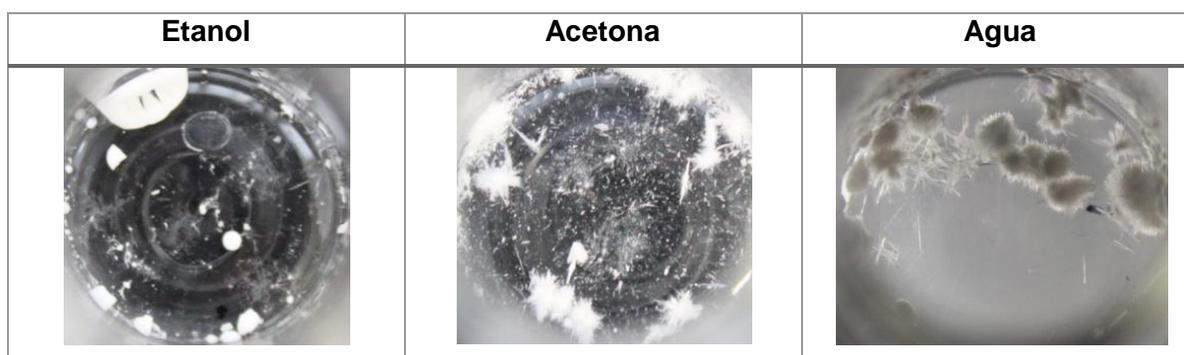
La cristalización en solución, tradicional y sus variantes, se describieron en la sección 6.4.3. Entre las variantes a la cristalización se pasó del uso de un solo disolvente a mezclas heterogéneas de disolventes, así como la distribución de los solutos entre disolventes inmiscibles. Se utilizó el volumen cercano a la saturación (concentración máxima de los solutos en un disolvente dado). En todos los casos, se verificó que todas las soluciones líquidas empleadas fueran homogéneas i.e. ausencia de sólidos de las MP. A continuación, se describen los distintos casos estudiados y sus resultados.

7.5.1 Cristalización en solución homogénea sobresaturada

Esta es la técnica de cristalización tradicional donde las MP se disuelven en un disolvente único o una mezcla de disolventes miscibles, y se permite la evaporación lenta.

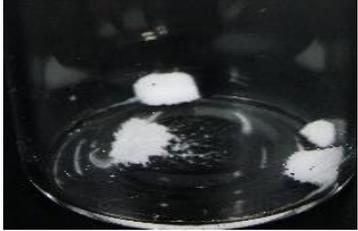
rac-Guai se sometió a las condiciones de cristalización tradicional con un solo disolvente donde observamos que puede cristalizar de formas diferentes en función del disolvente empleado (ejemplos en la imagen 2). Mientras que, los AQ mantienen su morfología después de que se deja evaporar el disolvente a TA (imagen no mostrada).

Imagen 2. Formas de cristalización de Guaifenesina racémica.



Se realizaron experimentos de cristalización en solución homogénea saturada utilizando acetona, diclorometano y etanol como disolventes. Empleando DMal, LMal y DLMal, se observaron cúmulos de forma irregular en el fondo del recipiente. Cuando se emplea DAsp y LAsp solo se observó la combinación heterogénea de polvos en el fondo del contenedor. Mientras que, en las combinaciones entre *rac*-Guai con DTar y LTar, se obtuvo una sustancia viscosa transparente con apariencia de gel. En la imagen 3 se muestra, de manera representativa, algunos ejemplos de las observaciones sobre experimentos de la técnica de cristalización entre *rac*-Guai con DTar y LMal en diferentes proporciones estequiométricas y mezcla de disolventes.

Imagen 3. Observaciones de la cristalización de Guaifenesina racémica en diferentes disolventes orgánicos.

Imágenes del vial	Composición (IFA:AQ)	Solvente utilizado (composición)
	<i>rac</i> -Guai:DTar (1:1)	Acet
	<i>rac</i> -Guai:DTar (1:1)	EtOH:CH ₂ Cl ₂ (50:50)
	<i>rac</i> -Guai:LMal (1:1)	Etanol

Debido a estas observaciones y a la falta de sólidos como producto final no fue posible el análisis de DRXP y se descartó el uso de la técnica de cristalización en solución homogénea saturada para la obtención de una NFS. A causa de esto se propone utilizar la cristalización en solución bifásica como se describe en la sección siguiente.

7.6 Cristalización en solución bifásica

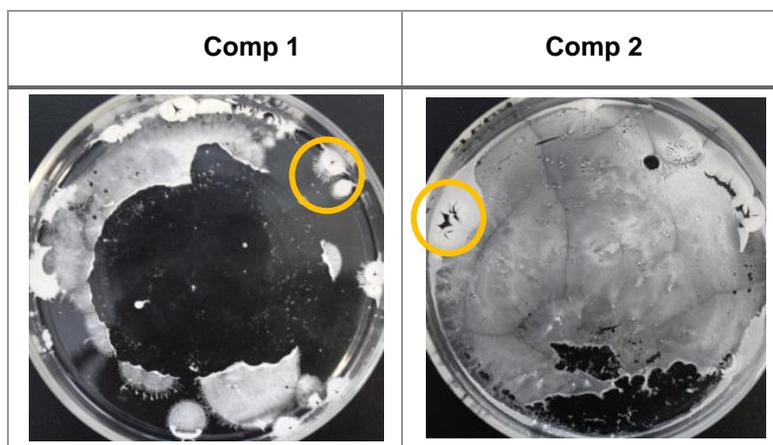
La cristalización bifásica o cristalización en la interfase (sección 6.4.3.1) utiliza dos disolventes inmiscibles pero capaces de disolver a las MP. A continuación, se describen los resultados obtenidos.

7.6.1 Cristalización en la interfase con soluciones saturadas y volúmenes iguales

Se utilizó agua y acetato de etilo como disolventes inmiscibles para disolver las MP hasta el punto de saturación en cada disolvente. Los AQ se disolvieron independientemente en A. de etilo y se colocaron primero en su contenedor. Posteriormente se adicionó la solución saturada acuosa de *rac*-Guai sobre la solución orgánica. Los volúmenes empleados para la cristalización son iguales.

Debido a la diferencia de solubilidades de los AQ, para los ácidos málicos se emplearon 5 mL de solución orgánica (Comp 1) y 13 mL para para las soluciones con ácidos tartáricos (Comp 2). Los volúmenes de *rac*-Guai en solución acuosa saturada para Comp 1 y Comp 2 fueron 5 y 13 mL, respectivamente. Las fotografías en la imagen 4, muestran las formas de cristalización de *rac*-Guai después de que se permitió la libre evaporación de los disolventes.

Imagen 4. Cristalización en la interfase con volúmenes equivalentes



En la figura 28 se muestra el análisis de DRXP del producto recuperado de los contenedores (representado por los círculos amarillos de la imagen 4) comparando los PDRX con las MP de las composiciones: *rac*-Guai con DMal y *rac*-Guai con DTar.

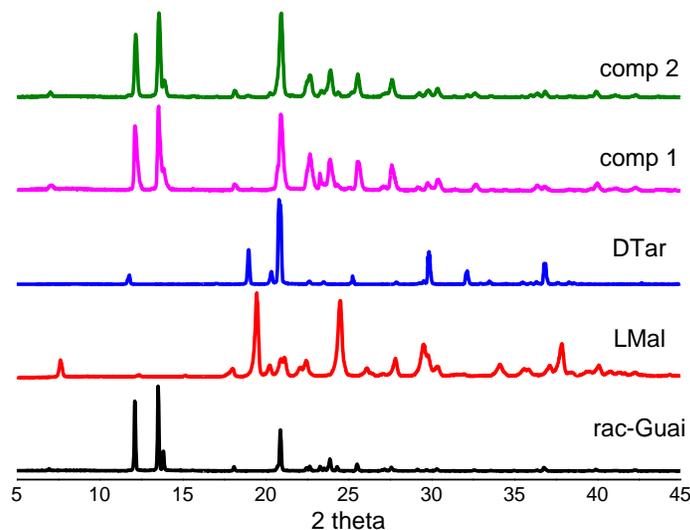


Figura 28. Cristalización en la interfase con volúmenes iguales. Se comparan comp 1 y comp 2 contra las materias primas.

Observando la figura 28 concluimos que los patrones de difracción tanto del comp 1 y comp 2 son similares al de *rac*-Guai. Mediante este análisis podemos comprobar que, bajo estas condiciones de cristalización, *rac*-Guai no interacciona con el AQ, e incluso llega a excluirlo porque no se observa LMal ni DTar en los difractogramas.

7.6.1.1 **Cristalización en la interfase**

Hasta este punto experimental, no se han observado indicios de una NFS entre *rac*-Guai con los ácidos málicos en RxM o RxS (anexo 1). Por lo tanto, se decidió descartar este AQ para posteriores experimentos.

De esta sección en adelante se muestran los resultados experimentales de las modificaciones aplicadas a las cristalizaciones entre *rac*-Guai con los ácidos tartáricos (DTar y LTar) que si han tenido indicios de una NFS mediante los experimentos de RxS en diferentes estequiometrías (figura 24-26).

En la técnica de cristalización en la interfase usamos volúmenes iguales de las soluciones saturadas. En esta ocasión modificamos la técnica (ver sección 6.4.4 inciso a) y fijamos la relación estequiométrica 1:3 (IFA:AQ) con cada MP en su respectivo disolvente y, en consecuencia, los volúmenes empleados no son iguales. Por lo tanto, compensamos el volumen de la fase superior para evitar la rápida evaporación del disolvente más volátil.

En una caja Petri se colocaron 36.2 mL de solución saturada de DTar en A. de Etilo (69.4 mg, 0.46 mmol). Además, se preparó la solución saturada de *rac*-Guai (30.6 mg, 0.15

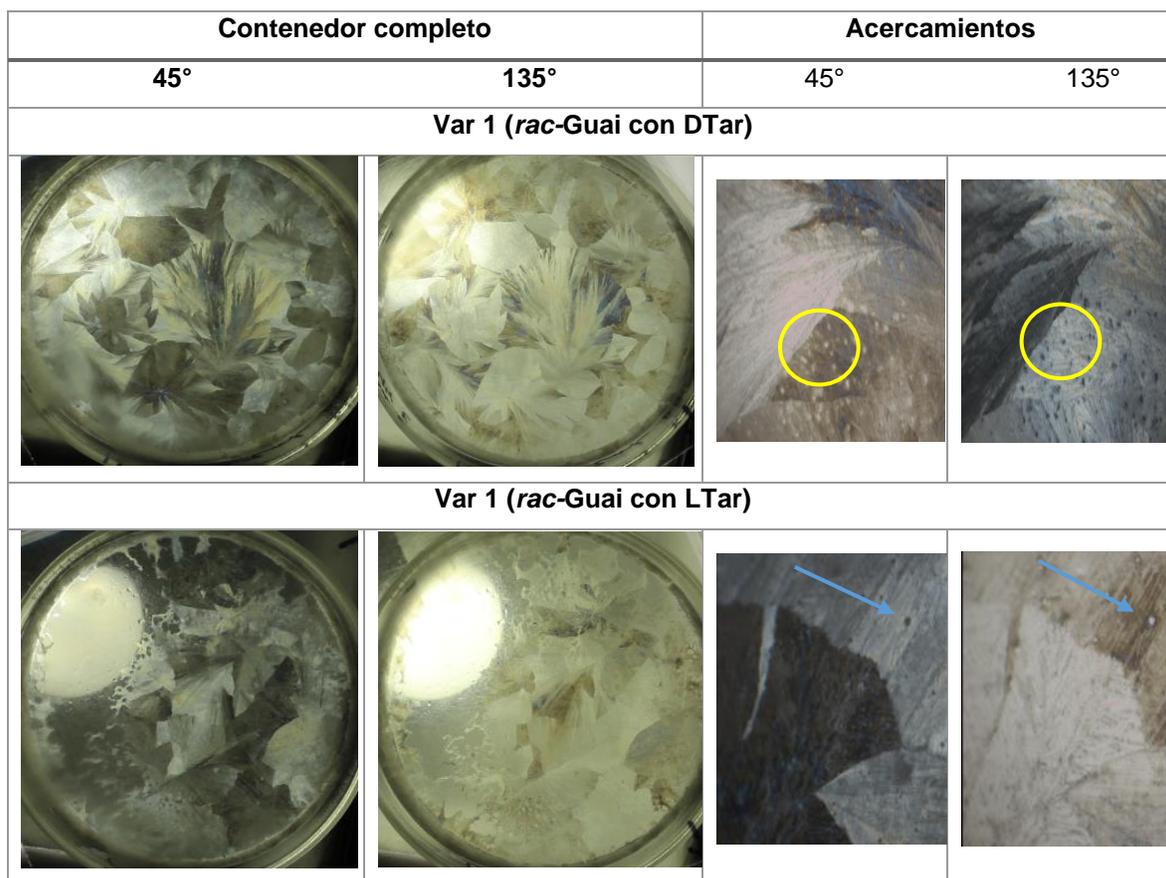
mmol) en 1.6 mL de agua, y se compensó el volumen con 25 mL de agua. Esta solución acuosa se colocó encima de la solución orgánica. A este experimento lo denominamos variante 1 (Var 1).

En la imagen 5, mostramos el precipitado obtenido y como se observa a simple vista. En la imagen 6, se muestran las fotografías, y sus acercamientos, del mismo precipitado cuando se utilizan placas polarizadas con una rotación de 45° y 135° . Este procedimiento también se realizó LTar.



Imagen 5. Película obtenida del experimento de cristalización en la interfase de *rac*-Guai:DTar 1:3

Imagen 6. Cristalización en la interfase con volumen compensado (Var 1) de *rac*-Guai en agua y DTar en acetato de etilo.



De acuerdo con las fotografías de la imagen 6, se observa un fenómeno similar a los cristales de clorato de sodio con la luz polarizada al rotar las placas de 45° a 135° (sección 2.4.2.1 e imagen 1). Cuando aplicamos este análisis tanto para las variantes de *rac*-Guai con DTar (círculos) como para la combinación *rac*-Guai con LTar (flechas), se presenta una notoria interacción con la luz polarizada al cambiar el giro de las placas y observar la inversión de la tonalidad del cristal. Incluso es posible apreciar pequeños núcleos que intercambian de tono respecto a su alrededor. Sin embargo, una inspección visual de ambos experimentos nos indica que la cristalización se produjo en capas superpuestas tal que los cambios de coloración y sus intensidades no son homogéneas en la superficie del recipiente.

De manera particular, se recuperaron dos fracciones del experimento entre *rac*-Guai con LTar que mostraron interacción con la luz polarizada (fracción A y B), para ser analizados por DRXP (figura 29).

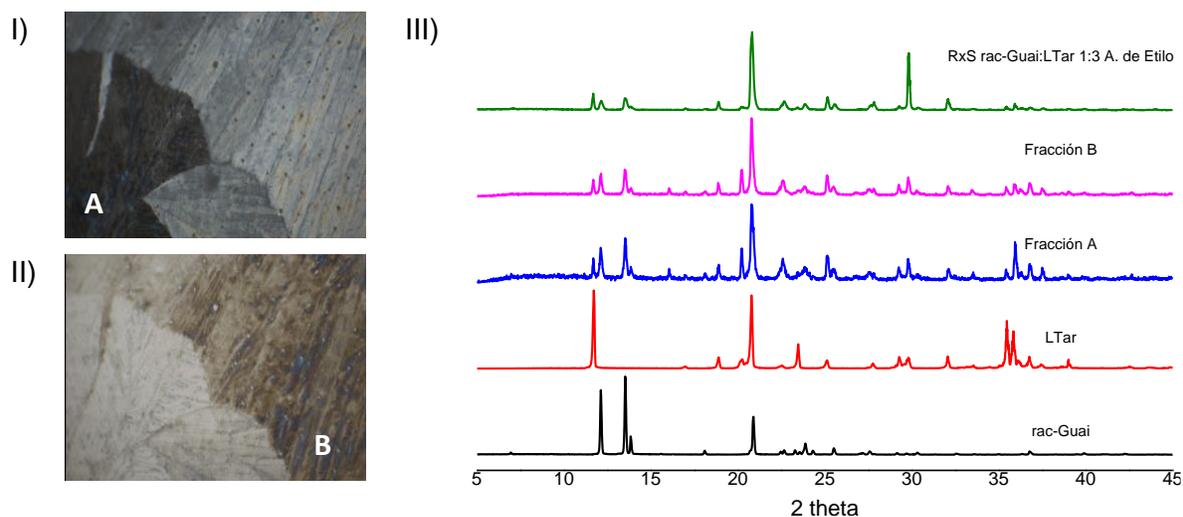


Figura 29. Sólido recuperado de la cristalización en la interfase Var 1 de *rac*-Guai con LTar, donde: I) fracción del cristal A opaca a 45°, II) fracción del cristal B opaca a 135° y III) PDRX de las materias prima comparado con las fracciones que presentaron interacción con la luz polarizada.

Comparando los difractogramas de las MP con las fracciones recuperadas del experimento de cristalización de la Var 1, particularmente la que contiene *rac*-Guai con LTar, encontramos los mismos picos característicos de las materias prima en ambas muestras, determinando que en cada parte del cristal analizado se encuentran ambos materiales. Adicionalmente, se anexa en la figura 29 el difractograma de la RxS de la mezcla *rac*-Guai:LTar 1:3 en A. de Etilo para fines comparativos; donde, observamos el mismo PDRX determinando que mediante esta técnica se pueden encontrar las MP.

7.6.1.2 Sembrado en líquido

Se realizó la variante 2 (Var 2) entre *rac*-Guai con DTar y LTar, respectivamente. En esta técnica no se compensa el volumen como en Var 1, sino que se respeta el volumen de las soluciones para mantener la fracción estequiométrica 1:3 (ver sección 6.4.4 inciso b). Var 2 consiste en agregar el volumen de una solución acuosa saturada de *rac*-Guai (1.6 mL, 0.15 mmol) sobre una solución saturada de A de Etilo de DTar (36.2 mL, 0.46 mmol). Estas cantidades se usaron de acuerdo con la estequiometría 1:3 y considerando obtener 100 mg de producto.

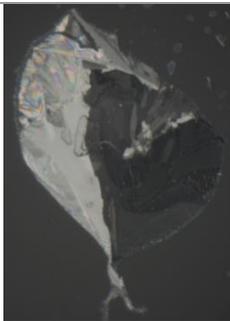
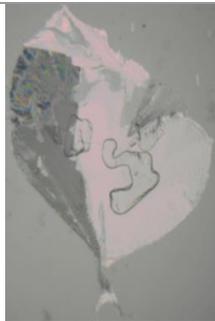
La imagen 7 es la fotografía del cristal recuperado de este experimento a simple vista, mientras que en la imagen 8, mostramos algunas observaciones de análisis a través de la luz polarizada.



Imagen 7. Fotografía del cristal obtenido del experimento de cristalización por sembrado en líquido (Var 2) de *rac*-Guai:DTar 1:3

De acuerdo con las observaciones del análisis a través de placas polarizadas, la variante 2 de *rac*-Guai con DTar presenta un cristal que manifiesta notoriamente la interacción con la luz polarizada al rotar las placas de 45° a 135°, esto puede indicar la separación quiral del fármaco.

Imagen 8. Sembrado en líquido (Var 2) de *rac*-Guai en agua y DTar en acetato de etilo en saturación.

Contenedor completo		Acercamientos	
Var 2 (<i>rac</i>-Guai con DTar)			
45°	135°	45°	135°
			
Var 2 (<i>rac</i>-Guai con LTar)			
		Sin imagen	Sin imagen

Cabe mencionar que no logramos obtener la imagen aumentada de Var 2 cuando se emplea *rac*-Guai con LTar mediante el análisis de luz polarizada, debido a que no se formaron cristales y tampoco hubo una divergencia en las tonalidades.

Las dos fracciones del cristal de *rac*-Guai con DTar de la variante 2 que tuvieron una mayor interacción con la luz polarizada a 45° y 135° (fracción Izq y Der), fueron recuperadas para ser analizadas por DRXP (figura 30).

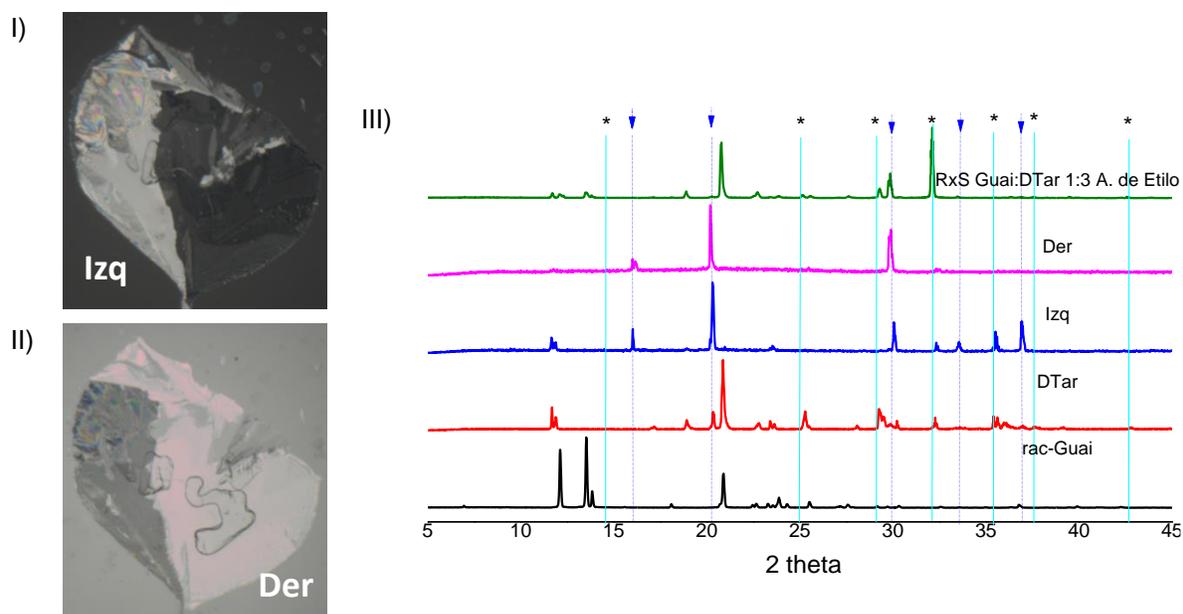


Figura 30. Sólido recuperado de la cristalización en la interfase (Var 2) de *rac*-Guai con DTar, donde: I) fracción del cristal Izq clara a 45°, II) fracción del cristal Der clara a 135° y III) PDRX de las materias prima comparado con las fracciones que presentaron interacción con la luz polarizada.

En el análisis de DRXP de este cristal, se muestra un patrón de difracción significativamente diferente comparado con las materias prima, específicamente la parte Der del cristal, donde parece que hay una NFS, mientras que la parte Izq aún tiene señales de la MP DTar. Las líneas punteadas y flechas muestran las principales señales pertenecientes a la supuesta NFS de la cristalización en la interfase.

En el difractograma de la figura 30, se anexa el PDRX de la cristalización por RxS de *rac*-Guai:DTar 1:3 en A. de Etilo con el fin de comparar las señales del cristal obtenido mediante la reacción de cristalización en la interfase de la Var 2. Las señales de la RxS marcadas con las líneas sólidas y asteriscos aparecen en diferente ángulo de difracción que las señales de la supuesta NFS del cristal obtenido en la reacción de cristalización en la interfase (Var 2).

Con base en estas observaciones, modificamos el volumen del contenedor para la Var 2. Pasando de cajas Petri de vidrio (50 mL) a viales de 30 mL, por tanto, también se redujeron los volúmenes de las soluciones de los componentes y el área expuesta al aire.

Se hicieron dos series de experimentos con diferentes volúmenes denominadas Var 3 y Var 4 (tabla 4). La Var 3, empleada en la cristalización de *rac*-Gua:DTar, consistió en colocar 9.05 mL de la solución saturada de DTar en acetato de etilo y después 0.4 mL de la solución saturada de *rac*-Guai en agua. Y la Var 4, usada con *rac*-Guai:LTar, consistió en aumentar los volúmenes de los componentes al doble, es decir, 0.8 mL de la solución de *rac*-Guai y 18.1 mL de LTar. Los volúmenes utilizados corresponden a la estequiometría 1:3 (IFA:AQ).

Tabla 4. Composición de las mezclas para Var 3 y 4.

Variante	Soluto	Volumen en saturación (mL)
Var 3	<i>rac</i> -Guai	0.4
	DTar	9.05
	<i>rac</i> -Guai	0.4
	LTar	9.05
Var 4	<i>rac</i> -Guai	0.8
	DTar*	18.1
	<i>rac</i> -Guai	0.4
	LTar	18.1

* También se utilizó DTar en esta variante de cristalización.

De las series Var 3 y Var 4 se obtuvieron los cristales que se muestran en las imágenes 9 y 10, respectivamente, así como su análisis a través de placas polarizadas. En el anexo 5 se muestran algunos ejemplos de las reproducciones de Var 3.

Imagen 9. Observaciones de los cristales obtenidos sin filtro y a través de placas polarizadas a 45° y 135°

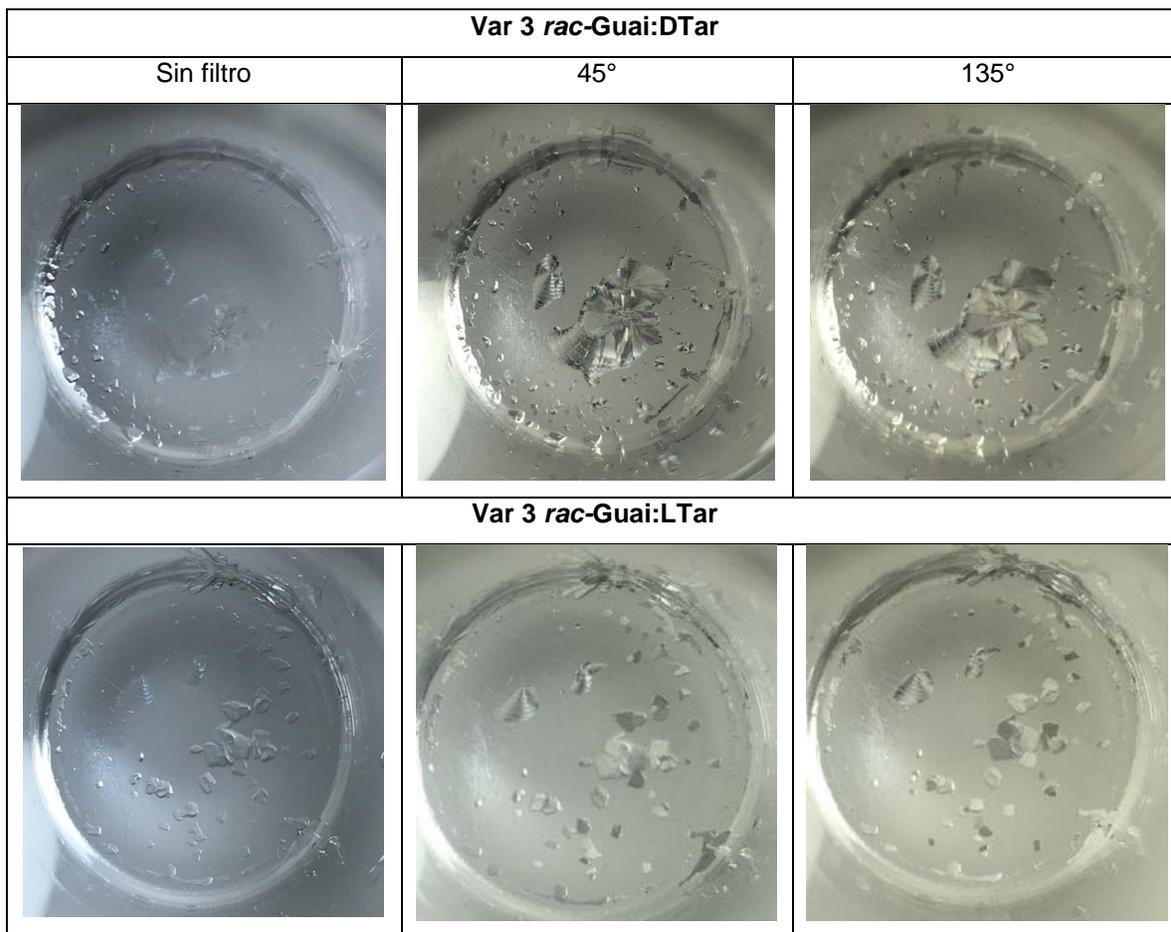
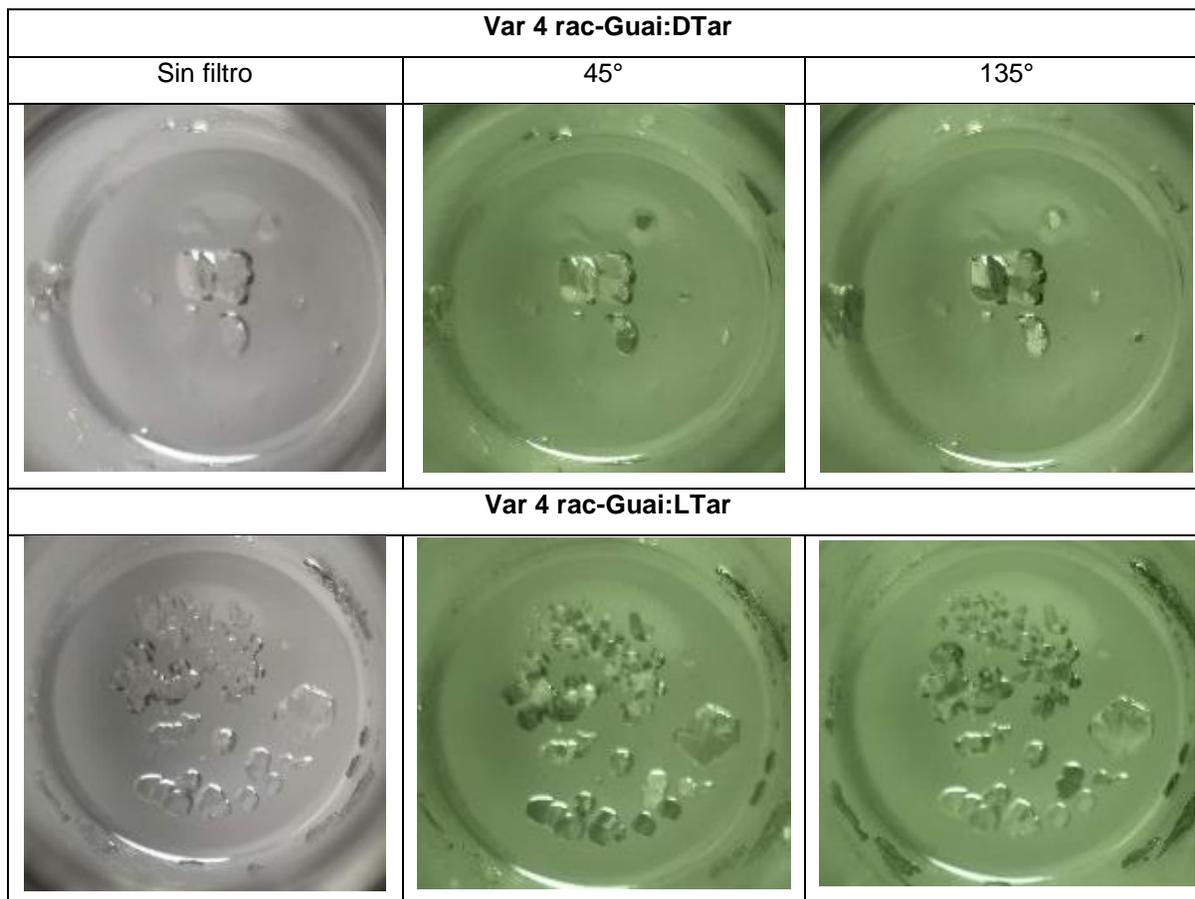


Imagen 10. Observaciones de los cristales obtenidos sin filtro y a través de placas polarizadas a 45° y 135°



De las fotografías de los experimentos con viales de 30 mL se obtuvieron cristales discretos con una forma irregular y que interactúan con la luz polarizada cuando se hace girar la placa a 45° y 135°.

Algunos de los cristales mostrados se colectaron cuidadosamente de manera manual para los estudios de polarimetría en solución que se presentan en la siguiente sección.

7.7 Polarimetría

Los cristales se identificaron como claros u opacos a partir de las placas polarizadas colocadas en ángulo de 45°. Esto para los experimentos descritos en la sección anterior, Var 3 y 4 tanto de *rac*-Guai:DTar como de *rac*-Guai:LTar (1:3), se pesaron para luego disolverlos en 1 mL de agua y se midió su rotación óptica. Los valores resultantes de cada cristal y de las MP se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Rotación óptica de los cristales recuperados a partir de las placas polarizadas colocadas en ángulo de 45° de las Var 3 y 4 de *rac-Guai:DTar* y *rac-Guai:LTar* con estequiometría 1:3 (IFA:AQ).

Experimento	Composición		Concentración [mg/mL]	$[\alpha]_{D^{20}}$ (exp)	$[\alpha]_{D^{20}}$ (Tar)	$^{\S}\Delta[\alpha]_{D^{20}}$
MP	<i>rac</i> -Guai		10	+0.84	--	--
	S-Guai*		11	+13.7	--	--
	DTar		10.1	-15.04	-15.04	0
	LTar		9.9	+17.04	+17.04	0
Var 3	<i>rac</i> -Guai	Opaco	4.2	-7.5	-6.25	-1.25
	+ DTar	Claro	5.6	-12.62	-8.34	-4.28
	<i>rac</i> -Guai	Opaco	8.5	+13.01	+14.63	-1.62
	+ LTar	Claro	5.4	+8.9	+9.29	-0.39
Var 4	<i>rac</i> -Guai	Opaco	9.9	-12.83	-14.74	+1.91
	+ DTar	Claro	8.8	-15.48	-13.10	-2.38
	<i>rac</i> -Guai	Opaco	6.3	+9.25	+10.84	-1.59
	+ LTar	Claro	7.4	+12.57	+12.74	-0.17

*Datos tomados de la referencia 78.

$$^{\S}\Delta[\alpha]_{D^{20}} = [\alpha]_{D^{20}}(\text{exp}) - [\alpha]_{D^{20}}(\text{Tar})$$

Para calcular aportación a la RO del ácido tartárico ($[\alpha]_{D_{20}}(\text{Tar})$) empleamos la regla de proporcionalidad utilizando la concentración del cristal, multiplicándolo por la RO experimental ($[\alpha]_{D_{20}}(\text{exp})$) y dividiéndolo entre la concentración del AQ. Mientras que para el cálculo de $\Delta[\alpha]_{D_{20}}$ se consideró sustraer la aportación del AQ y así obtener solo la RO que es proporcionada por Guai. Se utilizaron las RO experimentales de los ácidos tartáricos (MP) en forma enantiopura para la realización de estos cálculos y obtener datos más precisos respecto a la aportación de Guai en la RO.

De acuerdo con los resultados de rotación óptica (RO) de los cristales clasificados como opacos y claros, para las mezclas de *rac*-Guai + DTar en Var 3 y 4, se obtuvieron valores cercanos a DTar de signo negativo. Sin embargo, presentan diferencias con el valor teórico esperado (tabla 5, $[\alpha]_{D^{20}}(\text{Tar})$) si los cristales contuvieran solo el aditivo quiral. De tal manera que la diferencia de RO (tabla 5, $\Delta[\alpha]_{D^{20}}$) sugiere la presencia del fármaco. En todos los casos se observan diferencias negativas excepto para la Var 4 en región oscura que resulto ser positiva (+1.91) y la región clara de -2.38. Lo que nos haría pensar que ocurre una desracemización del fármaco debido a la diferencia entre los signos.

Para el caso de las mezclas de *rac*-Guai + LTar en Var 3 y 4, también se obtuvieron valores de RO cercanos a LTar y de signo positivo. Los valores de las diferencias de RO presentan valores de signo negativo. Nuevamente sugieren la presencia del fármaco en la estructura del cristal. Sin embargo, parece que no ha ocurrido una resolución enantiomérica sino un enriquecimiento enantiomérico tal que las diferencias de RO son una contribución mínima y, aparentemente, aleatoria del fármaco.

En el caso del AQ LTar, las diferencias en RO son tan pequeñas como -0.17 y -0.39. De tal manera, es posible pensar que el fármaco se encuentra en forma racémica o que no está presente en el cristal. Mientras que con DTar se obtienen diferencias en RO significativas, sin embargo no es posible establecer que enantiómero de Guai se ha seleccionado preferentemente.

Se seleccionaron algunos cristales de las diferentes variantes (1 a 4) que mostraron diferencias en los estudios de polarimetría, con las placas polarizadas y con polarímetro, para ser analizados por RMN-¹H como se detalla en la siguiente sección.

7.8 Resonancia magnética nuclear ¹H

Los cristales seleccionados de los experimentos de cristalización se analizaron utilizando la técnica de RMN-¹H para establecer la posible relación estequiométrica y la integridad molecular.

En la figura 31 se presentan los espectros de las materias primas con las señales características que emplearemos para establecer la estequiometría (cuadros azules). En el caso de Guai utilizamos las señales correspondientes a los cuatro hidrógenos aromáticos (6.86 – 6.95 ppm), y para los ácidos tartáricos las señales correspondientes a los hidrógenos alifáticos CH (4.54 y 4.49 ppm).

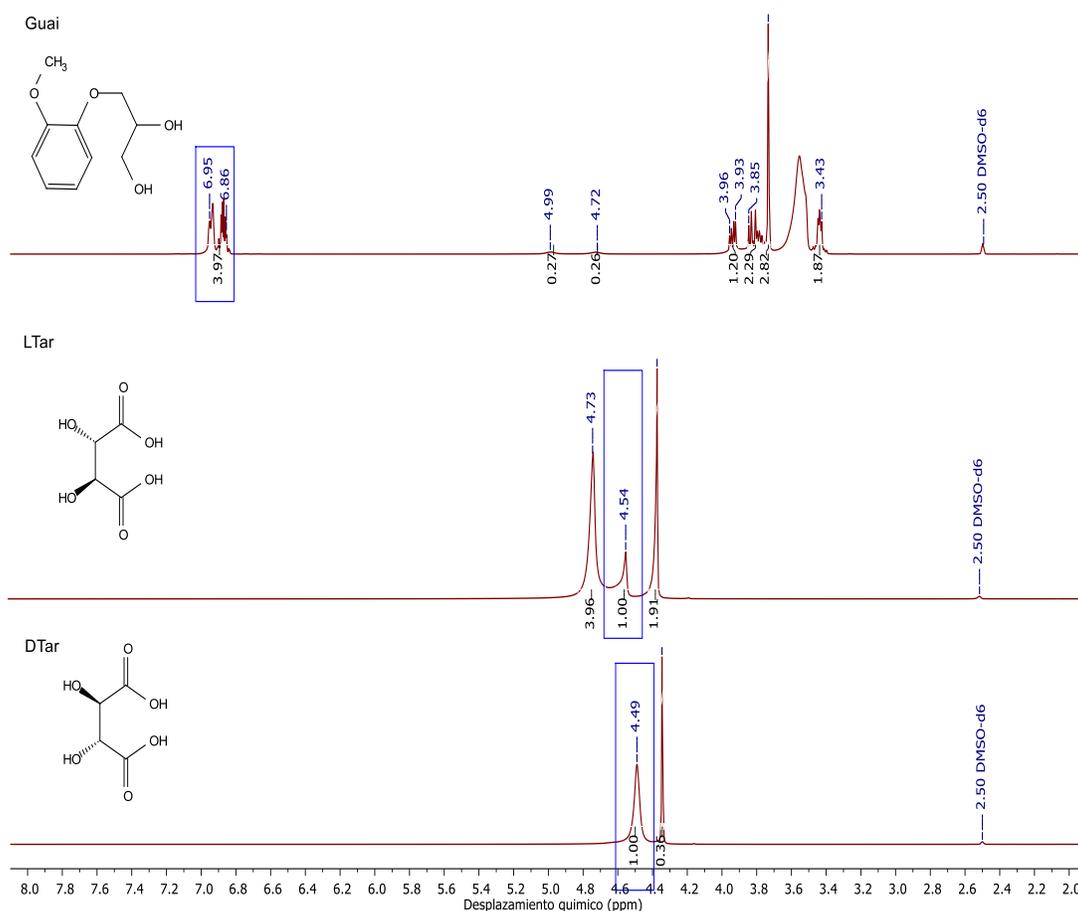
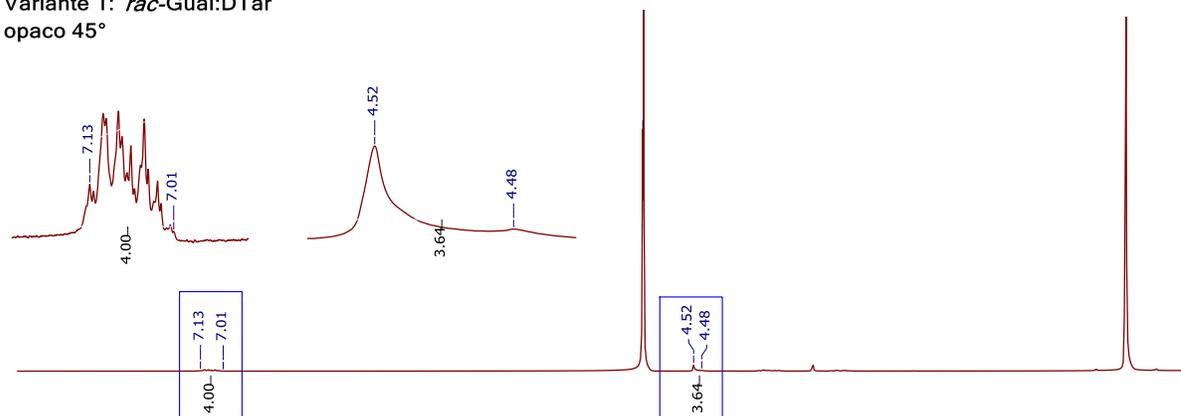


Figura 31. Espectros de RMN- ^1H de las materias primas.

La figura 32 presenta los espectros de RMN- ^1H del experimento de cristalización Var 1 con *rac*-Guai:DTar (ver descripción en la imagen 6) con las ampliaciones respectivas. En los espectros mostrados se observa una señal cercana a 4.8 ppm que corresponde a D_2O debido a que la mezcla no era soluble en DMSO-d_6 . En la parte superior de la figura 32, opaco a 45° , observamos un multiplete de 7.13 a 7.01 ppm con una integral relativa a 4 H, que corresponde al anillo aromático de Guai. Mientras que de 4.52 a 4.48 ppm aparece la señal correspondiente al carbono quiral de DTar con una integral relativa a 4 H.

Variante 1: *rac*-Guai:DTar
opaco 45°



Variante 1: *rac*-Guai:DTar
claro 45°

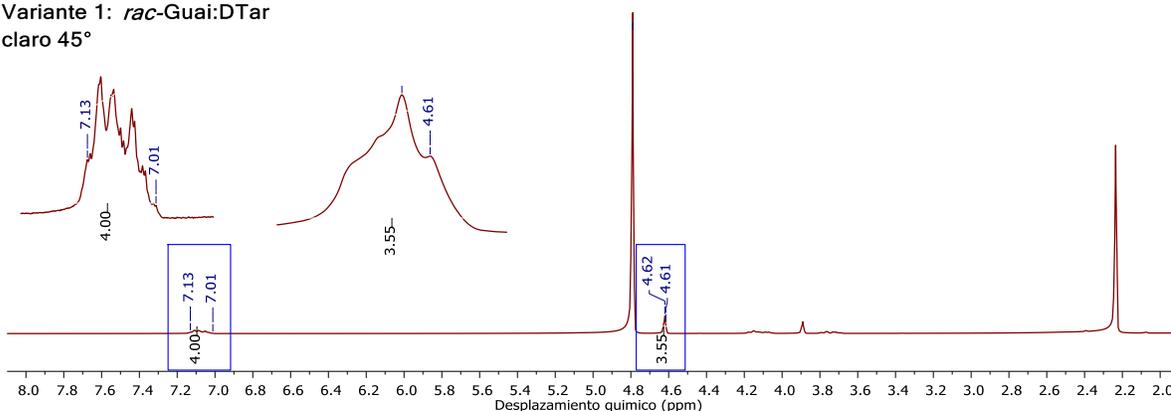


Figura 32. Espectros de RMN-¹H de la variante 1 entre: *rac*-Guai:DTar con estequiometría 1:3

En la parte inferior de la figura 32, claro a 45°, observamos un multiplete de 7.13 a 7.01 ppm con una integral relativa a 4 H, que corresponde al anillo aromático de Guai y de 4.62 a 4.61 ppm aparece la señal de DTar con una integral relativa de 4 H.

En ambos casos, los valores de las integrales sugieren una estequiometría Guai:DTar 1:2 en la fase cristalina.

La figura 33 muestra los espectros de RMN-¹H de Var 2 con *rac*-Guai:DTar (ver descripción en la imagen 8). De nuevo fue necesario emplear D₂O para solubilizar el cristal. En la parte superior, claro 45°, aparece el multiplete representativo de Guai, con un desplazamiento químico de 7.13 a 7.01 ppm que integran relativamente a 4 H y en 4.69 ppm aparece la señal de DTar que integra para 4 H. En la parte inferior de la figura 33, opaco 45°, se presenta la señal representativa de Guai de 7.13 a 7.01 ppm que integra relativamente a 4 H y a 4.59 ppm aparece la señal de DTar integrando relativamente a 4 H.

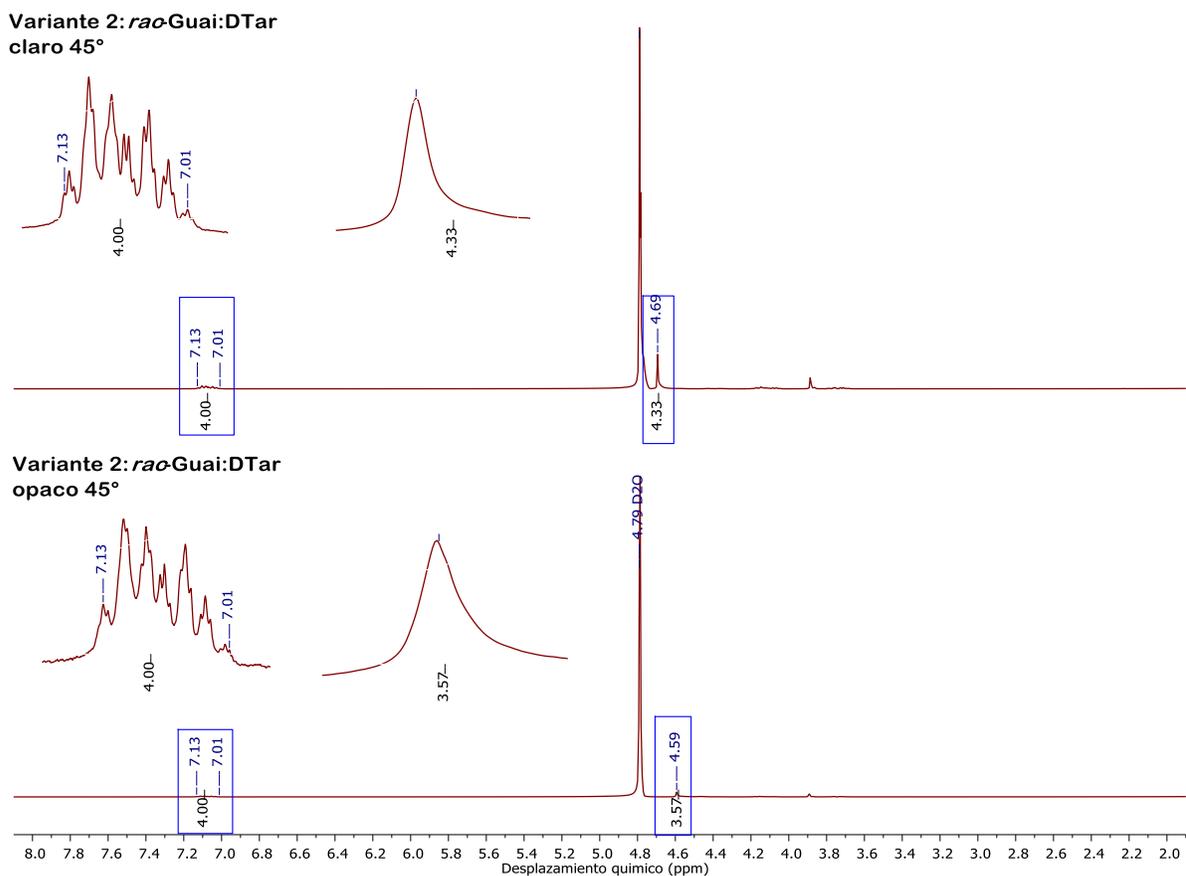


Figura 33. Espectros de RMN-¹H de la variante 2 entre: *rac*-Guai:DTar con estequiometría 1:3

De nueva cuenta, esta relación de integrales sugiere una estequiometría de Guai:DTar 1:2.

La figura 34 muestra los espectros de RMN-¹H de los cristales claros a 45° de la variante 3, con *rac*-Guai:DTar y *rac*-Guai:LTar en la parte superior e inferior (ver descripción en la imagen 9), respectivamente.

En la parte superior de la figura 34, entre 7.12 a 7.0 ppm aparece el multiplete característico del anillo aromático de Guai integrando a 4 H, y de 4.70 a 4.72 aparece la señal de DTar integrando a 3 H.

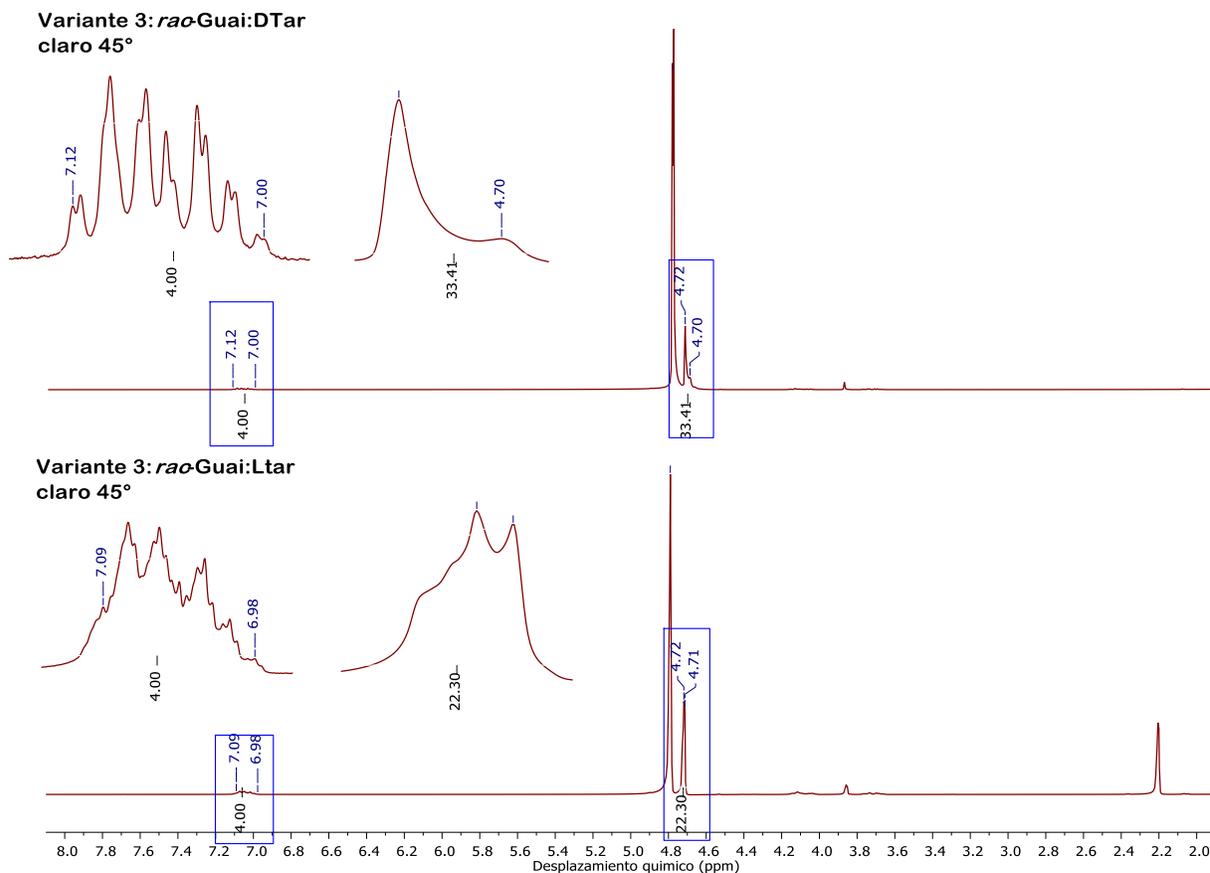


Figura 34. Espectros de RMN-¹H de la variante 3 entre: *rac*-Guai:DTar y *rac*-Guai:LTar con estequiometría 1:3

Mientras que, en la parte inferior, que corresponde a la mezcla *rac*-Guai:LTar, el multiplete característico de Guai aparece a 7.09 a 6.98 ppm integrando relativamente a 4 H y la señal del LTar aparece de 4.72 a 4.71 ppm integra relativamente a 22 H.

En el caso de Var 3 se observa que no hay una relación estequiometría definida para el AQ. Al parecer, en el caso Guai:DTar se observa 1:17 y para Guai:LTar 1:11. Esto discrepa de los resultados observados para Var 1 y 2. Esto también implica que, aunque los cristales son opacos y/o claros, el cambio de procedimiento de cristalización impacta sobre la relación Guai:Tar observada.

La figura 35 presenta los espectros de RMN-¹H de la cristalización Var 4 con los componentes *rac*:Guai:LTar (ver descripción en la imagen 10). En la parte superior de la figura, opaco a 45°, observamos un multiplete de 7.10 a 6.99 ppm con una integral relativa a 4 H característico del anillo aromático de Guai y a 4.72 ppm aparece la señal de LTar que integra relativamente a 17 H.

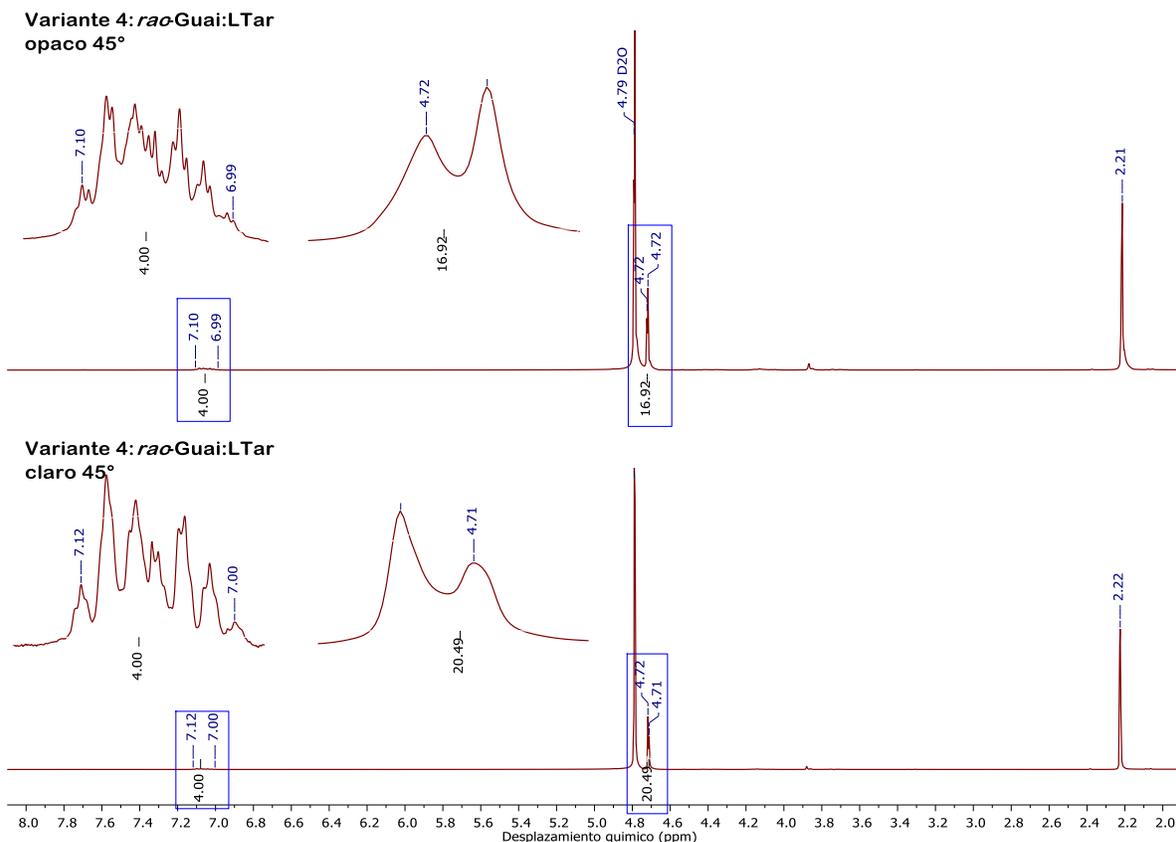


Figura 35. Espectros de RMN-¹H de la variante 4 entre: *rac*-Guai:LTar con estequiometría 1:3

El espectro de RMN-¹H perteneciente a los cristales denominados claro 45°, se presenta en la parte inferior de la figura 35. Aquí observamos el multiplete representativo de Guai de 7.12 a 7.0 ppm que relativamente integra a 4 H y la señal que aparece de 4.72 a 4.71 ppm que integra relativamente a 20 H pertenece a LTar.

En el caso de Var 4 observamos nuevamente que las relaciones estequiométricas involucran una gran cantidad del AQ. Siendo Guai:LTar 1:8.5 (región oscura) y 1:10 (región clara).

Del análisis de todos los espectros presentados podemos concluir que el procedimiento de cristalización tiene un efecto importante sobre la estequiometría entre el fármaco y el AQ. Particularmente, en la Var 2 y 4 se observa una congruencia entre las regiones claras y oscuras. Sin embargo, el exceso de AQ en las Var 3 y 4 explican el comportamiento de la RO, cuyos valores son más parecidos a los ácidos tartáricos y la contribución mínima se debe a la presencia de Guai.

En la tabla 6, se presentan los resultados de relación estequiométrica y rotación óptica para las cuatro variantes descritas. Particularmente para la Var 1 y 2 no se obtuvieron los valores de RO porque todo el material se empleó para la determinación de la estequiometría. Únicamente Var 3 y 4 presentan la información completa porque estos métodos permitían generar mayor cantidad de cristal y su forma permitía su separación más fácilmente.

Tabla 6. Predicción de la estequiometría en los productos recuperados en las variantes de cristalización.

Variante	Composición	Cristal	Relación IFA:AQ	$[\alpha]_{D^{20}}$ (exp)	$\Delta[\alpha]_{D^{20}}$
Var 1	<i>rac</i> -Guai + DTar	Opaco	1:2	n/a	n/a
		Claro	1:2	n/a	n/a
Var 2	<i>rac</i> -Guai + DTar	Opaco	1:2	n/a	n/a
		Claro	1:2	n/a	n/a
Var 3	<i>rac</i> -Guai + DTar	Claro	1:17	-12.62	-4.28
		<i>rac</i> -Guai + LTar	1:11	+8.9	-0.39
Var 4	<i>rac</i> -Guai + LTar	Opaco	1:8.5	+9.25	-1.59
		Claro	1:10	+12.57	-0.17

n/a: no se midió $[\alpha]_{D^{20}}$

La información de la tabla 6 se presenta de tal manera que, a pesar de la alta cantidad de ácido tartárico en los cristales, se obtienen valores de -4.28 en la composición *rac*-Guai:DTar (Var 3). Esto puede deberse a la presencia preferente de un enantiómero de Guai con DTar, provocando el distanciamiento una vez que se sustrajo la aportación a la RO de DTar. Una situación similar ocurre para *rac*-Guai:LTar (Var 4) que tiene una aportación a la RO de -1.59. En este caso la cantidad de Guai presente en el cristal es el doble que en Var 3, e.g. 1:8.5 es equivalente a 2:17; indicando a Guai enantioenriquecido en la muestra, pero no necesariamente en la misma magnitud.

Sin embargo, existen aportaciones a la RO con magnitudes entre -0.17 y -0.39. Esto puede implicar que la Guaifenesina presente en esos cristales contiene a la mezcla racémica.

Es importante remarcar que las diferencias de RO más pequeñas se observan con LTar y por tanto se sugiere que el fármaco prefiere cristalizar con LTar de manera racémica o con un enriquecimiento quiral pequeño. Mientras que con DTar la situación ocurre al contrario.

8 Conclusiones

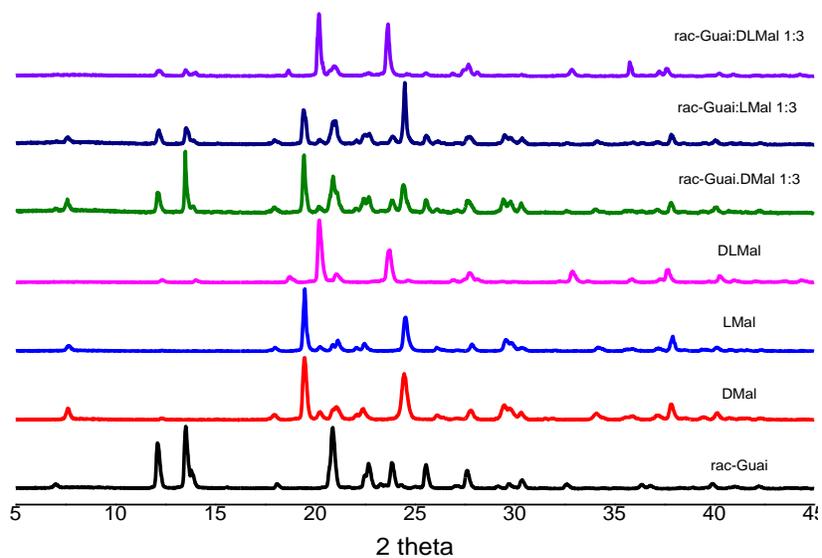
- A partir de las variantes experimentales de cristalización en la interfase, se generaron muestras físicas que contienen guaifenesina enantioenriquecida preferentemente con el ácido D-Tartárico.
- De los aditivos quirales seleccionados sólo los ácidos D- y L-Tartáricos fueron relevantes y los disolventes adecuados para los experimentos de cristalización fueron agua y acetato de etilo.
- De las técnicas de cristalización utilizadas en este proyecto, la cristalización en solución mostro cambios relevantes al obtener cristales, demostrando que existe una dependencia a la cantidad de disolvente.
- Mediante la RMN-¹H, se estableció la presencia de Guai en todos los cristales obtenidos de los experimentos de cristalización en la interfase; sin embargo, en la obtención de cristales influye la estequiometría de Guaifenesina y los ácidos tartáricos.
- El posible enantioenriquecimiento de Guaifenesina con los aditivos quirales y se podrían describir como RGuai-DTar + SGuai-DTar; sin embargo, no se ha establecido cual es preferido. En el caso de LTar, es posible que ocurran interacciones similares (RGuai-LTar + SGuai-LTar) o directamente RGuai-LTar-SGuai.

9 Perspectivas

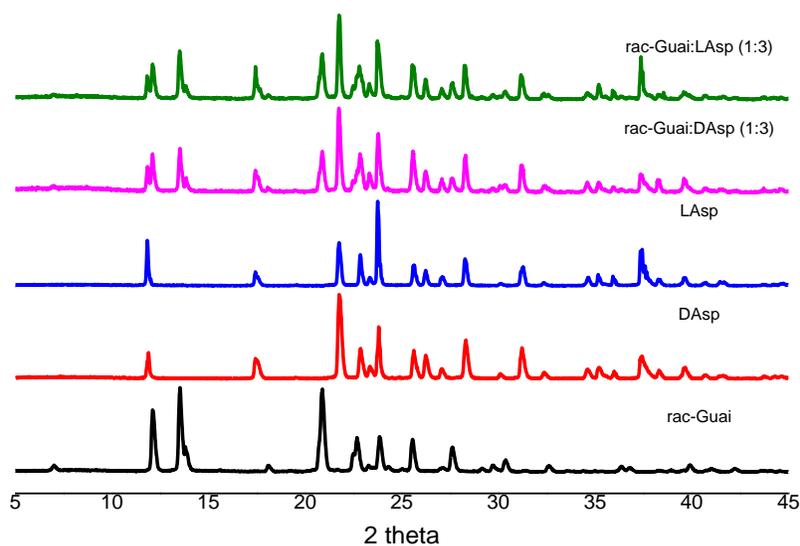
- Reproducir las cristalizaciones de variantes 1 y 2, verificar que la estequiometría Guai:AQ se mantenga y realizar los análisis polarimétricos. De tal manera se podrá establecer la relación entre la cantidad del AQ y el posible enriquecimiento quiral.
- Adecuar un método por HPLC con columna de fase estacionaria quiral (Chiralcel® OD) para establecer el exceso enantiomérico de los cristales obtenidos de las diferentes variantes de cristalización y establecer la configuración quiral del enantiómero de guaifenesina preferido.
- Experimentar nuevas cristalizaciones de guaifenesina con aditivos quirales que tengan características similares a la estructura de los ácidos tartáricos: al menos dos centros quirales y una cantidad considerable de grupos -OH en su estructura. Entre estos posibles nuevos AQ se encuentran los carbohidratos.
- Preparar co-cristales de las formas R- y S-Guaifenesina con el ácido LTar y caracterizar los co-cristales por RMN-¹H, difracción de rayos X de polvos y algunas propiedades físicas (solubilidad, por ejemplo) para poder realizar una mejor interpretación de los resultados.

10 Anexos

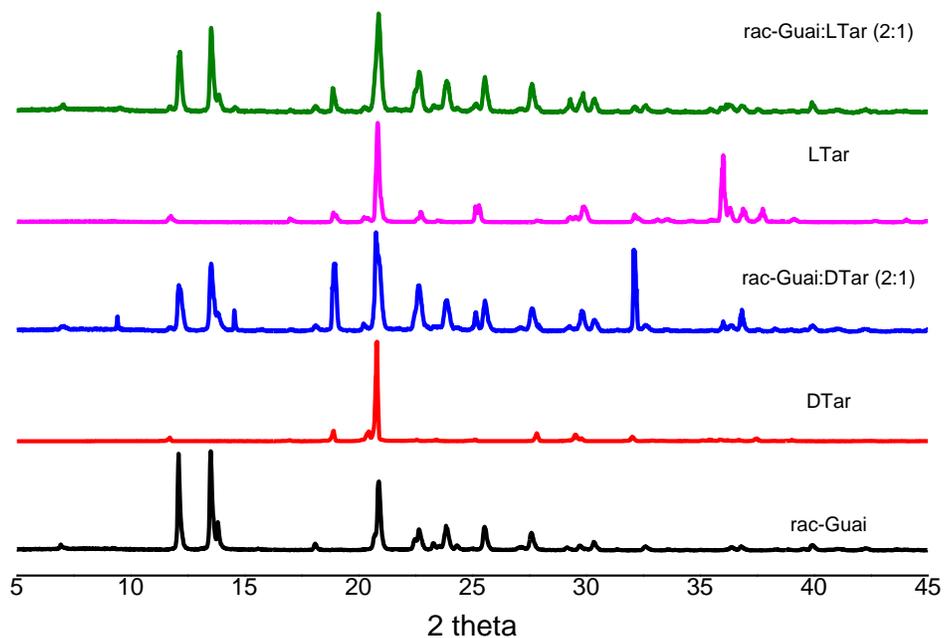
Anexo 1. Difractograma representativo del comportamiento de *rac*-Guaifenesina con los ácidos málicos (D, L y DL) con estequiometría 1:3 comparados con las materias prima en la reacción de slurry utilizando acetato de etilo como medio de reacción.



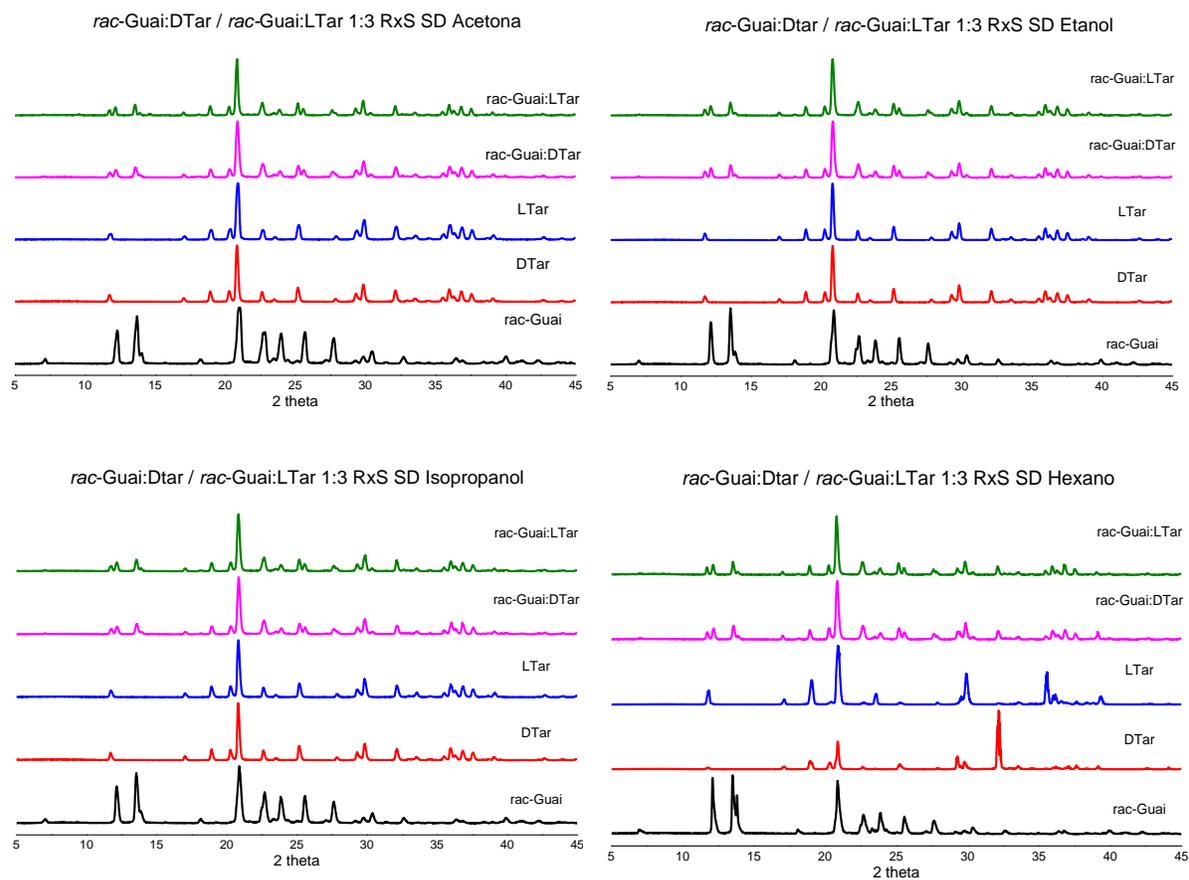
Anexo 2. Difractograma representativo del comportamiento de *rac*-Guaifenesina con los ácidos aspárticos (D y L) con estequiometría 1:3 comparados con las materias prima en la reacción de slurry utilizando acetato de etilo como medio de reacción.



Anexo 3. Difractograma representativo de la reacción de slurry de *rac*-Guaifenesina con los ácidos D y L Tartáricos con estequiometría 2:1 comparados con las materias prima utilizando acetona como medio de reacción.



Anexo 4. Difractogramas de RxM SD de a) *rac*-Guai:DTar 1:3 en Acetona. b) *rac*-Guai:LTar (1:3) y RxM SD utilizando acetato de etilo c) *rac*-Guai:DTar (1:3) y d) *rac*-Guai:LTar (1:3).



Anexo 5. Fotografías de la reproducción de la variante de cristalización Var 3.

Var 3 *rac*-Guai:LTar (1:3)

Sin filtro



45°



135°



Var 3 *rac*-Guai:DTar (1:3)



11 Bibliografía

1. Whyte LL. Chirality. *Pergamon Press*. 1975;8:245-248.
2. Carey, Francis A., Giuliano RM. *Química Orgánica*. 9th ed. (Carey, Francis A., Giuliano RM, ed.). Mexico: Traducido de la novena edición en inglés de Organic Chemistry, de Francis A. Carey y Robert M.; 2014.
<https://books.google.com.mx/books?id=c3eJDAAAQBAJ&pg=PR4&dq=Francis+A.+Carey.+Robert+M.+Giuliano.+Química+Orgánica.+Novena+edición&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiMpcHjpoXYAhVDwiYKHUqaD30Q6AEIJzAA#v=onepage&q=Francis A. Carey. Robert M. Gi.>
Accessed December 12, 2017.
3. Hegstorm RA, Kondepudi DK. The handedness of the universe. *Sci Am*. 1990;262(January):108-115. doi:10.1038/scientificamerican0190-108.
4. (IUPAC Recommendations 1996). Chirality Centre.
<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iupac/stereo/BC.html#19>. Accessed December 12, 2017.
5. Thompson HB. The Criterion for Optical Isomerism. *J Chem Educ*. 1960;17(10):530-531.
6. Weininger SJ, Stermitz FR. *Química Orgánica*. Reverté; 1988.
7. Tomás Alonso F. *Química Orgánica Estructural*. Universidad de Murcia; 1993.
8. LIN G-Q, YOU Q-D, CHENG J-F. *Chiral Drugs : Chemistry and Biological Action.*; 2011.
9. Morrison RT, Boyd RN, Zugazagoitia Herranz R, Fiedler P. *Química Orgánica*. Addison Wesley Longman; 1998.
10. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*. 4th ed. (Omega 2006, ed.). doi:10.1007/s11655-011-0820-1.
11. Nguyen L, He H P-HCCDAOIJBS 2006;(2): 85–100. Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci*. 2006;2(2):85-100.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674971>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3614593>.
12. Chong-Hui G DJ. *Chirality In Drug Design And Development*. (MEHVA R, REDDY IK, eds.); 2004.
13. Córdova-Villanueva EN, Rodríguez-Ruiz C, Sánchez-Guadarrama O, et al. Diastereomeric Salt Formation by the γ -Amino Acid RS-Baclofen and L-Malic Acid: Stabilization by Strong Heterosynthons Based on Hydrogen Bonds between RNH₃⁺ and COOH/COO⁻ Groups. *Cryst Growth Des*. 2018;18(12):7356-7367. doi:10.1021/acs.cgd.8b00990.

14. Géraldine Springuel TL. Innovative Chiral Resolution Using Enantiospecific Co-Crystallization in Solution. *Cryst Growth Des.* 2012;12:3374–3378. doi:10.1021/cg300307z.
15. Viedma L. Rutas de acceso a compuestos enantioméricamente puros . 2013.
16. Francotte E, Lindner W. *Chirality in Drug Research.* (Federsel H-J, ed.); 2006.
17. D. D, Mastai Y. Biomimetic Polymers for Chiral Resolution and Antifreeze Applications. In: *On Biomimetics.* InTech; 2011. doi:10.5772/21082.
18. Viedma-Molero C. ROTURA DE LA SIMETRÍA EN LA CRISTALIZACIÓN QUIRAL: PRODUCTOS FARMACEÚTICOS Y EL ORIGEN DE LA VIDA. *Vida Cient.* 2014;(Figura 1):52-59.
19. Busch KW, Busch MA. *Chiral Analysis.* Elsevier; 2006.
20. Bailey J. Chirality and the origin of life. 2000;46(10-12):627-631. papers3://publication/uuid/1081B0B8-C2ED-4294-AEBE-E7F0CAD9D8B9.
21. Bonner WA. The origin and amplification of biomolecular chirality. *Orig Life Evol Biosph.* 1991;21(2):59-111. doi:10.1007/BF01809580.
22. Breslow R, Cheng Z-L. On the origin of terrestrial homochirality for nucleosides and amino acids. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(23):9144-9146. doi:10.1073/pnas.0904350106.
23. Leitereg TJ, Guadagni DG, Harrys J, Mon TR, Teranishi R. Evidence for the Difference between the Odours of the Optical Isomers (+)- and (-)-Carvone. *Nat New Biol.* 1971;230(5):455-456. doi:10.1038/229560a0.
24. Leitereg TJ, Guadagni DG, Harris J, Mon TR, Teranishi R. Chemical and Sensory Data Supporting the Difference between the Odors of the Enantiomeric Carvones. *J Agric Food Chem.* 1971;19(4):785-787.
25. Geithe C, Krautwurst D. Chirality Matters - Enantioselective Orthologous Odorant Receptors for Related Terpenoid Structures. *ACS Symp Ser.* 2015;1212:161-181. doi:10.1021/bk-2015-1212.ch012.
26. Laszlo P. Extracting the essence from the peel. In: *Citrus : A History.* University of Chicago Press; 2007:252.
27. Food and Drugs Administration. Development of New Stereoisomeric Drugs | FDA. doi:Docket ID : FDA-2013-S-0610.
28. SAMPER ESTHER (SHORA). La catástrofe de la talidomida | soitu.es. http://www.soitu.es/soitu/2008/01/13/salud/1200254040_132284.html. Published 2008.

Accessed December 12, 2017.

29. Vázquez S. La catástrofe de la talidomida en el cincuentenario de su comercialización. *Principado Astur*. 2009;l:34-37.
30. Catalina RB. Estudio sobre la utilización de la talidomida desde los trágicos años sesenta hasta la actualidad . Análisis desde la perspectiva legal y ética . 2012:43.
http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/32366/1/Romaguera_TFG_2012.pdf.
31. Behr A, Neubert P. Applied Homogeneous Catalysis. *Angew Chemie Int Ed*. 2012;52(6):716. doi:10.1002/anie.201208808.
32. Research C for DE and. Guidances (Drugs) - Development of New Stereoisomeric Drugs. <https://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm122883.htm>. Accessed December 12, 2017.
33. Parreiras G, Da E, Noël F. Estudios de bioequivalencia para fármacos que presentan estereoisomerismo. *In Vitro*. 2004:41-43.
34. Pajaro-Castro NP, Olivero-Verbel JT. Química verde: Un nuevo reto. *Cienc e Ing Neogranadina*. 2011;21(2):169-182.
35. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. 2001;409(January):258-268.
36. Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol*. 2007;25(2):66-73. doi:10.1016/j.tibtech.2006.12.005.
37. Woodley JM. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol*. 2008;26(6):321-327. doi:10.1016/j.tibtech.2008.03.004.
38. Nestl BM, Nebel BA, Hauer B. Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol*. 2011;15(2):187-193. doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.019.
39. Shan N, Zaworotko MJ. The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discov Today*. 2008;13(9-10):440-446. doi:10.1016/j.drudis.2008.03.004.
40. Puigjaner C, Barbas R, Portell A, Prohens R. Cocristales farmacéuticos el nuevo reto. *Med Clin (Barc)*. 2009;419(18):42-54. doi:10.1016/j.medcli.2009.05.026.
41. Saucedo-Balderas MM, Zuñiga-Lemus O, Ortegoñ-Reyna D, González-González JS. Los cocristales farmacéuticos: conceptos generales. *An Real Acad Farm*. 2014;80(2):265-273.
42. Herrera-Ruiz D. ¿ Qué sabe Ud. acerca de ... los co-cristales farmacéuticos ? *Rev Mex ciencias Farm*. 2010;41. doi:10.1038/80833.

43. Childs SL, Rodríguez-Hornedo N, Reddy LS, et al. Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. *CrystEngComm*. 2008;10(7):856-864. doi:10.1039/b715396a.
44. Bučar DK, Henry RF, Duerst RW, Lou X, MacGillivray LR, Zhang GGZ. A 1:1 cocrystal of caffeine and 2-hydroxy-1-naphthoic acid obtained via a slurry screening method. *J Chem Crystallogr*. 2010;40(11):933-939. doi:10.1007/s10870-010-9766-y.
45. Takata N, Shiraki K, Takano R, Hayashi Y, Terada K. Cocrystal screening of stanolone and mestanolone using slurry crystallization. *Cryst Growth Des*. 2008;8(8):3032-3037. doi:10.1021/cg800156k.
46. Kojima T, Tsutsumi S, Yamamoto K, Ikeda Y, Moriwaki T. High-throughput cocrystal slurry screening by use of in situ Raman microscopy and multi-well plate. *Int J Pharm*. 2010;399(1-2):52-59. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.07.055.
47. Colucci A. Efficient Co-crystal Screening Using Solution-Mediated Phase Transformation GEOFF. *J Pharm Sci*. 2006;96(5):990-996. doi:10.1002/jps.
48. Trask A V., Jones W. Crystal engineering of organic cocrystals by the solid-state grinding approach. *Top Curr Chem*. 2005;254:41-70. doi:10.1007/b100995.
49. Delori A, Frišić T, Jones W. The role of mechanochemistry and supramolecular design in the development of pharmaceutical materials. *CrystEngComm*. 2012;14(7):2350-2362. doi:10.1039/c2ce06582g.
50. Shan N, Toda F, Jones W. Mechanochemistry and co-crystal formation: Effect of solvent on reaction kinetics. *Chem Commun*. 2002;2(20):2372-2373. doi:10.1039/b207369m.
51. Chadwick K, Davey R, Cross W. How does grinding produce co-crystals? Insights from the case of benzophenone and diphenylamine. *CrystEngComm*. 2007;9(9):732-734. doi:10.1039/b709411f.
52. Trask A V, Motherwell WDS, Jones W. Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem Commun (Camb)*. 2004;(7):890-891. doi:10.1039/b400978a.
53. Sánchez-Guadarrama O, Mendoza-Navarro F, Cedillo-Cruz A, et al. Chiral Resolution of RS-Praziquantel via Diastereomeric Co-Crystal Pair Formation with L-Malic Acid. *Cryst Growth Des*. 2016;16(1):307-314. doi:10.1021/acs.cgd.5b01254.
54. Springuel G, Robeyns K, Norberg B, Wouters J, Leyssens T. Cocrystal formation between chiral compounds: How cocrystals differ from salts. *Cryst Growth Des*. 2014;14(8):3996-4004. doi:10.1021/cg500588t.

55. Habgood M. Analysis of enantiospecific and diastereomeric cocrystal systems by crystal structure prediction. *Cryst Growth Des.* 2013;13(10):4549-4558. doi:10.1021/cg401040p.
56. Eccles KS, Deasy RE, Fábíán L, Braun DE, Maguire AR, Lawrence SE. Expanding the crystal landscape of isonicotinamide: Concomitant polymorphism and co-crystallisation. *R Soc Chem.* 2011;13(23):6923-6925. doi:10.1039/c1ce06320k.
57. Food and Drugs Administration. SCOGS (Select Committee on GRAS Substances). <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS>. Accessed December 12, 2018.
58. Elbagerma MA, Edwards HGM, Munshi T, Hargreaves MD, Matousek P, Scowen IJ. Characterization of new cocrystals by raman spectroscopy, powder X-ray diffraction, differential scanning calorimetry, and transmission raman spectroscopy. *Cryst Growth Des.* 2010;10(5):2360-2371. doi:10.1021/cg100156a.
59. Karki S, Fábíán L, Frišćić T, Jones W. Powder X-ray diffraction as an emerging method to structurally characterize organic solids. *Org Lett.* 2007;9(16):3133-3136. doi:10.1021/ol071329t.
60. Harada N. Chiral Molecular Science: How were the absolute configurations of chiral molecules determined? "Experimental results and theories." *Chirality.* 2017;29(12):774-797. doi:10.1002/chir.22748.
61. Lyle RE, Lyle GG. A Brief History of Polarimetry. *J Chem Educ.* 1964;41(6):308-313. doi:10.1021/ed041p308.
62. The Origin of Chirality in the Molecules of Life : A Revision From Awareness to the Current Theories and Perspectives of This Unsolved Problem. <https://eds-b-ebSCOhost-com.libproxy.unm.edu/eds/ebookviewer/ebook/bmxIYmtfXzQ5Njg3OV9fQU41?sid=6516320a-33b4-4833-9fa0-f6e32b0c3d66@pdc-v-sessmgr05&vid=0&format=EB&rid=1>. Accessed November 8, 2018.
63. Kondepudi DK, Bullock KL, Digits JA, Hall JK, Miller JM. Kinetics of Chiral Symmetry Breaking in Crystallization. *J Am Chem Soc.* 1993;115(22):10211-10216. doi:10.1021/ja00075a041.
64. Kondepudi DKK, Kaufman RJJ, Singh N. Chiral symmetry breaking in sodium chlorate crystallization. *Science (80-).* 1990;250(4983):975-976. doi:10.1126/science.250.4983.975.
65. Viedma C, Coquerel G, Cintas P. Crystallization of Chiral Molecules. In: *Handbook of Crystal Growth: Second Edition*. Vol 1. Second Edi. Elsevier B.V.; 2014:951-1002. doi:10.1016/B978-0-444-56369-9.00022-8.

66. Buhse T, Durand D, Kondepudi D, Laudadio J, Spilker S. Chiral Symmetry Breaking in Crystallization: The Role of Convection. *Phys Rev Lett.* 2000;84(19):4405-4408. doi:10.1103/PhysRevLett.84.4405.
67. Kondepudi DK, Kaufman RJ, Singh N. Chiral Symmetry Breaking in Sodium Chlorate Crystallization. *Science (80-)*. 1990;250(4983):975-976. doi:10.1126/science.250.4983.975.
68. Kondepudi DK, Bullock KL, Digits JA, Yarborough PD. Stirring Rate as a Critical Parameter in Chiral Symmetry Breaking Crystallization. *J Am Chem Soc.* 1995;117(1):401-404. doi:10.1021/ja00106a045.
69. Aem A. Ficha técnica dobutamina. 2011:1-8. papers3://publication/uuid/3EDB58FB-EBD3-4668-B96A-33450BCCF9FE.
70. Laboratorios Induquímica S.A. *GUAIFENESINA*. <http://www.induquimica.com/media/insertos/42.pdf>. Accessed December 12, 2017.
71. Ramírez Ochoa V. Revisión Farmacológica. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/atfm121/revfarma.html>. Accessed December 12, 2017.
72. Murillo-Godínez G, De Revisión A. Uso ilícito de modelantes y efectos adversos. *Med Interna México Vol Med Int Mex.* 2010;2626(44):346-349. http://www.cmim.org/boletin/pdf2010/MedIntContenido04_08.pdf. Accessed December 12, 2017.
73. Commissioner O of the. Safety Alerts for Human Medical Products - Children's Guaifenesin Grape Liquid and Guaifenesin DM Cherry Liquid by Perrigo Company: Recall - Potential Defect with Dosage Cup. <https://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/safetyalertsforhumanmedicalproducts/ucm481563.htm>. Accessed December 12, 2017.
74. Street LB. *Unapproved Prescription Cough, Cold, and Allergy Products*. Vol 5.; 2010. doi:10.1039/b000000x.
75. Import Alert 66-40. https://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_189.html. Accessed May 21, 2018.
76. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>. Accessed May 22, 2018.
77. Fayzullin RR, Lorenz H, Bredikhina ZA, Bredikhin AA, Seidel-Morgenstern A. Solubility and some crystallization properties of conglomerate forming chiral drug guaifenesin in water. *J*

Pharm Sci. 2014;103(10):3176-3182. doi:10.1002/jps.24104.

78. Bredikhina ZA, Novikova VG, Zakharychev D V., Bredikhin AA. Solid state properties and effective resolution procedure for guaifenesin, 3-(2-methoxyphenoxy)-1,2-propanediol. *Tetrahedron Asymmetry.* 2006;17(21):3015-3020. doi:10.1016/j.tetasy.2006.10.027.
79. Latorre R. *Biofísica Y Fisiología Celular.* Universidad de Sevilla; 1996.
80. Wells AF. *Química Inorgánica Estructural.* Reverté; 1978.

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Pablo Luis Gutierrez Vergara

Título de la tesis: "Estudios de cristalización enantioselectiva de rac-Guaifenesina con aditivos quirales"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

30/abril/19
Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: **Pablo Luis Gutierrez Vergara**

Título de la tesis: **"Estudios de cristalización enantioselectiva de rac-Guaifenesina con aditivos quirales"**

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Sergio Alcalá Alcalá.**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

09/05/2018
Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Pablo Luis Gutierrez Vergara

Título de la tesis: "Estudios de cristalización enantioselectiva de *rac*-Guaifenesina con aditivos quirales"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Thomas Buhse Michelsen.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Firma del miembro del jurado

08/05/2019
Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: Pablo Luis Gutierrez Vergara

Título de la tesis: "Estudios de cristalización enantioselectiva de rac-Guaifenesina con aditivos quirales"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Herbert Höpfl Bachner.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA, UAEM**

Nombre del alumno: **Pablo Luis Gutierrez Vergara**

Título de la tesis: **"Estudios de cristalización enantioselectiva de rac-Guaifenesina con aditivos quirales"**

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Julio César Rivera Leyva.**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

13/05/2019

Fecha